

**Vitamin D-Bestimmung
mittels diätetisch induzierter
akuter Hypophosphatämie**

Ullrich Gelfert

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0081

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. H. Zucker

Vitamin D-Bestimmung
mittels diätetisch induzierter
akuter Hypophosphatämie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ullrich Gelfert
aus München

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Inhaltsübersicht

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. VITAMIN D, ENTSTEHUNG und METABOLISIERUNG	3
2.1 Vitamin D-Wirkung auf den Ca-Stoffwechsel	4
2.2 Vitamin D-Wirkung auf den P-Stoffwechsel	5
2.3 Regulation des Vitamin D-Stoffwechsels	7
3. VITAMIN D-BESTIMMUNGSMETHODEN	9
3.1 Chemische und physikalische Methoden	9
3.2 Biologische Methoden	11
3.3 Vergleichende Betrachtung der biologischen Tests	17
4. PROBLEMSTELLUNG	19
5. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	20
5.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen	20
5.2 Fütterung	20
5.3 Herstellung der verschiedenen Rationen	24
5.4 Blutgewinnung	24
5.5 Phosphorbestimmung	25
5.6 Statistische Methoden	26
6. VERSUCHSBESCHREIBUNGEN	28
6.1-6.11 Versuche I-XI	28
6.12 Goldhaferversuche	61
7. DISKUSSION	62
7.1 Wirkungsweise der Vordiäten	62

7.2	Wirkungsweise des Testfutters	63
7.3	Erklärung der tageszeitlichen Schwankungen der Serumphosphatwerte	64
7.4	Höhe der Serumphosphatwerte	65
7.5	Vergleich der Regressionsgeraden	66
7.6	Beurteilung des Meßbereiches	69
8.	ZUSAMMENFASSUNG	70
8.1	SUMMARY	72
9.	LITERATURVERZEICHNIS	74

1. Einleitung

Da diese Arbeit einen neuen biologischen Test beschreibt, soll zu Beginn kurz auf die Problematik des biologischen Tests und seine Berechtigung auf dem Gebiet der Vitamin D-Forschung eingegangen werden.

Der Vorteil biologischer Teste liegt darin, die Wirkung einer Probe auf den lebenden Organismus untersuchen zu können. Der jeweilige Untersuchungsparameter zeigt dann in diesem Falle den Einfluß von Vitamin D, seiner Provitamine usw. auf das Tier an. Über Tierversuche kann zum Beispiel auch verfolgt werden, in welchem Bereich eine Vitamin D-Gabe eine Rachitis behebt und ab welcher Höhe sie toxische Wirkungen hervorruft.

Die Nachteile der biologischen Teste liegen vor allem in dem hohen Aufwand, der betrieben werden muß. Zu nennen wären die Versuchstiere, deren Haltung, die Untersuchung des Testparameters und besonders die Länge der Versuchsdauer. Schwierigkeiten bereitet auch das Standardisieren, da jedes Einzeltier durch seine individuellen Schwankungen dieses Vorhaben erschwert.

Demgegenüber erlauben die chemisch-physikalischen Bestimmungsmethoden eine gute Standardisierung und bieten damit bessere Vergleichsmöglichkeiten der erhaltenen Ergebnisse. Bei ihnen müssen aber in der Regel mindestens 10 I.E. Vitamin D/g Untersuchungsmaterial enthalten sein, bei nicht reinen Vitamin D-Präparationen wie zum Beispiel Lebens- und Futtermittel sogar noch viel mehr. Schuld daran sind besonders die Reinigungsschritte biologischer Proben, um interferierende Substanzen entfernen zu können, die zu Vitamin D-Verlusten führen. Rein technisch ist aber die Gaschromatographie in der Lage, Vitamin D noch in einer Konzentration von 0,01 µg nachzuweisen. Damit können die in der Tabelle 1 angegebenen Lebensmittel kaum über die chemisch-physikalischen Verfahren hinsichtlich ihres Vitamin D-Gehaltes beurteilt werden. Das gleiche gilt für die meisten

Futtermittel, die in 1g TS etwa 0,2-0,5 I.E. Vitamin D₂ oder D₃ enthalten. Diese geringen Vitamin D-Konzentrationen lassen sich nach Verfütterung an die Tiere nachweisen, da viele biologischen Tests in der Lage sind, den Effekt von 0,5 I.E./Tier, einmalig oder über mehrere Tage gegeben, anzuzeigen.

Erst über Tierversuche war es möglich zu beweisen, daß der Hypervitaminose D- ähnliche Krankheitsbilder durch Pflanzen, wie *Solanum malacoxylon* (= *S. glaucophyllum*) nach WORKER und CARILLO (1967), *Cestrum diurnum* (KROOK et al. 1975a, KROOK et al. 1975b) und *Trisetum flavescens* nach DIRKSEN et al. (1972) verursacht werden. Bei der Strukturaufklärung des wirksamen Prinzips dieser Pflanzen durch chemisch-physikalische Methoden waren die biologischen Tests unerlässlich, da nur sie anzeigen konnten, ob eine isolierte Substanz der Krankheitsverursacher ist oder nicht. So gelang es schließlich HAUSSLER et al. (1976a), ein Glykosid des 1,25-(OH)₂D₃ im *Solanum malacoxylon* und HUGHES et al. (1977), ein Glykosid des 1,25-(OH)₂D₃ auch im *Cestrum diurnum* nachzuweisen.

Tabelle 1

Vitamin D-Gehalt verschiedener Lebens- und Futtermittel

(auszugsweise entnommen von BEKEMEIER u. PFENNIGSDORF, 1974)

	Vit. D, I.E./g bzw ml
Orient. Thunfisch (Fischleberöl)	45.000
Sardine (Ganzkörperdurchschnitt)	15-20
Hering (Ganzkörperdurchschnitt)	3-13
Vollmilch	0,005-0,1
Käse (Vollfettstufe)	0,008-0,3
Trockenei	0,5-3
Rindsleber	0-0,5
Schweineleber	0-0,1
Fleisch	0
Grüngemüse	0
Gras	0
Heu (sonnengetrocknet)	0,03-1,8

2. Vitamin D, Entstehung und Metabolisierung

Eine ganze Reihe von Steroidderivaten zeigt eine antirachitische Wirksamkeit. Von ernährungsphysiologischer und therapeutischer Bedeutung sind Vitamin D₂ (Ergocalciferol), identifiziert von ASKEW et al. (1931) und WINDAUS et al. (1932), und Vitamin D₃, dessen Struktur von WINDAUS et al. (1936) und SCHENCK (1937) aufgeklärt wurde. Das Vitamin D₂ entsteht durch photochemische Umwandlung unter Einwirkung ultravioletter Strahlen aus dem Provitamin "Ergosterin", das vor allem in Pilzen, aber auch in Pflanzen vorkommt. Vitamin D₃ dagegen wird beim Menschen und den Tieren ebenfalls durch UV-Bestrahlung aus 7-Dehydrocholesterin gebildet.

Der tierische Organismus besitzt mehrere Möglichkeiten, seinen Bedarf an Vitamin D zu decken. Er kann mit der Nahrung entweder Provitamine oder Vitamin D₂ und D₃ selbst aufnehmen. Die Resorption erfolgt im Dünndarm. Dabei bringen die Gallensäuren das fettlösliche Vitamin D in eine wasserlösliche, resorbierbare Form. Zu Beginn des Ileums ist der Speisebrei nahezu völlig fettfrei, so daß die Resorption der Fette und damit auch des fettlöslichen Vitamin D im unteren Duodenum und im Jejunum erfolgt. Das resorbierte Provitamin und Vitamin D werden über die Lymphe und das Blut weitertransportiert. Das Provitamin gelangt dabei über die Blutbahn in die Kapillargefäße der Haut und in das Unterhautgewebe, wo es durch die UV-Bestrahlung entweder zum Vitamin D₂- oder D₃ umgewandelt wird. Daneben kann der Organismus aus Cholesterin in der Leber 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D₃) bilden, das dann im Hautbereich zu Vitamin D₃ umgewandelt wird. Weder in der Leber noch in anderen Organen können bedeutende Vitamine D-Depots angelegt werden. Bei ausreichender UV-Bestrahlung der Tiere (Weidehaltung) kann die Eigensynthese des Körpers allein den Bedarf decken, im Winter dagegen (Stallhaltung) spielt das Angebot an Vitamin D im Futter eine entscheidende Rolle.

Überdosierungen des Vitamin D führen zu einer Kalziferol-vergiftung. Toxische Dosen mobilisieren aus dem Skelett vermehrt Calcium und Phosphat. Es kommt zu einer Ablagerung von Calcium in den Wänden der Nierentubuli, in den Gefäßen und der Lunge usw. Der Tod kann dann zum Beispiel durch Nierenversagen eintreten.

Bevor aber das Vitamin D seine physiologischen und pathologischen Wirkungen zeigen kann, bedarf es zweier Umwandlungsschritte:

1. Zuerst wird das Vitamin D_3 in der Leber durch Hydroxylierung am Kohlenstoffatom-25 zu 25 - Hydroxycholecalciferol ($25 - (\text{OH})\text{D}_3$) umgewandelt (PONCHON und DELUCA, 1969; PONCHON et al., 1969).
2. Die zweite Hydroxylierung findet nach FRASER und KODICEK (1970) in der Niere statt. LAWSON et al. (1971) isolierten diesen Metaboliten aus Nierenhomogenaten und identifizierten ihn als 1,25-Dihydroxycholecalciferol ($1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$), den am stärksten wirksamen Metaboliten des Vitamin D. HOLICK et al. (1971) gelang noch im gleichen Jahre die Isolierung von $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ aus dem Hühnerdarm. $25 - (\text{OH})\text{D}_3$ kann nach SUDA et al. (1970) außer zu $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ noch zu $21,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ und nach HOLICK et al. (1972) in der Niere zu $24,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ umgewandelt werden. Es gilt nach BOYLE et al. (1973) als Vorläufer des 1,24,25-Trihydroxycholecalciferols, das nach KLEINER - BOSSALLER und DeLUCA (1974) auch aus $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ entstehen kann.

2.1 Vitamin D-Wirkung auf den Ca-Stoffwechsel

WASSERMAN und TAYLOR (1968) entdeckten, daß Vitamin D im Dünndarmepithel die Bildung eines spezifischen "calcium binding protein" (CaBP) bewirkt. Wenig später gelang es CORRADINO et al. (1968), dieses CaBP auch aus dem Uterus von Legehennen zu isolieren. Nach CORRADINO (1973a) blockieren Actinomycin D und α -Amanitin, zwei Transcriptionsinhibitoren, die $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung auf den Calciumtransport im

Darm. Daraus läßt sich schließen, daß $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ über die mRNA-Synthese die Bildung des CaBP bewirkt. Über das CaBP wirkt $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ als metabolisch aktive Form auf die Ca-Absorption aus dem Darm (TANAKA et al., 1971; BOYLE et al., 1972). BRUMBAUGH und HAUSSLER (1974) isolierten für $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen spezifischen cytosomalen Rezeptor aus dem Darmepithel. Daneben stimuliert $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ noch die Mobilisierung von Calcium aus den Knochen (TANAKA und DeLUCA, 1971).

Das von SUDA et al. (1970) isolierte und identifizierte $21,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ hat nur einen geringen Effekt auf die Ca - Absorption aus dem Dünndarm, aber eine große Wirkung auf die Mobilisierung des Calciums aus den Knochen. Es tritt nach BOYLE et al. (1971) vermehrt bei Normokalzämie statt $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf und wird hauptsächlich in der Niere gefunden. Vielleicht spielt es eine schützende Rolle, indem es die tubuläre Rückresorption von Calcium herabsetzt und so eine Hyperkalzämie verhindert. Das von HOLICK et al. (1972) entdeckte $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird in der Niere gebildet und besitzt, wie HENRY et al. (1976) berichten, eine stärkere Wirkung auf die Ca-Absorption aus dem Darm als auf die Mobilisierung des Calciums aus den Knochen. Es bleibt zu untersuchen, ob $24,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur eine Stufe zur Inaktivierung des Vitamin D_3 ist und damit den Organismus vor einer zu großen Bildung des $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ bewahrt, oder ob es noch unbekannte Funktionen besitzt.

2.2 Vitamin D-Wirkung auf den P-Stoffwechsel

CARLSSON (1954) erkannte, daß das Vitamin D einen Einfluß auf die P-Absorption aus dem Darm hat, da Vitamin D_3 -Mangel zu deren Absinken führt und Vitamin D_3 -Gaben die Absorption steigern. HARRISON und HARRISON (1961) berichteten, daß Phosphat im Darm gegen einen thermodynamischen Gradienten befördert wird. Dazu ist Energie nötig. Dies deutete auf

einen aktiven Transport hin. Sie hielten für diesen Transport Calcium für nötig, im Gegensatz zu KOWARSKI und SCHACHTER (1969), die berichteten, daß der Mucosa-Serosa-Transport des Phosphats im Dünndarm von Ratten kein Calcium benötige; dies gilt in gleicher Weise auch für den Transport des Calciums im Dünndarm. TAYLOR (1974) untermauerte deren These. CHEN et al. (1974) wiesen nach, daß $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die P-Absorption erhöhen. Da bei Tieren nach Totalnephrektomie $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ unwirksam war, mußte $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die aktive Form des Vitamin D_3 für die P-Absorption sein. Daß sich die einzelnen Dünndarmabschnitte hinsichtlich dieser P-Absorption unterschiedlich verhalten, zeigten PETERLIK und WASSERMAN (1978) für den Hühnerdarm. Danach findet im Duodenum ein großer P-Transport statt, der durch Vitamin D_3 -Gaben kaum gesteigert werden kann. Im Jejunum liegt dagegen bei Vitamin D_3 -Mangel fast kein P-Transport vor, nach Vitamin D_3 -Gabe erreicht er dagegen nahezu die gleiche Höhe wie im Duodenum. Das Ileum weist kaum einen P-Transport auf, auch nicht nach Vitamin D_3 -Gabe. Sie sprechen von der Existenz eines "Carrier-gesteuerten, energieabhängigen Mechanismus" des P-Eintritts in die epitheliale Zelllage des Dünndarms, der durch Vitamin D_3 stimuliert wird. Gewicht erhält diese Annahme dadurch, daß Inhibitoren der Proteinsynthese die Wirkung des $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ auf den P-Transport völlig blockieren (PETERLIK und WASSERMAN, 1976). Die Natur der Energieaufnahme in den P-Absorptionsmechanismus und die Eigenschaften eines hypothetischen Carriers bleiben noch zu erforschen.

BIRGE und MILLER (1977) fanden bei ihren Versuchen, daß $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die Aufnahme von ^{32}P aus dem Darm schon nach 30 min bewirkt, erst danach steigt die ^{45}Ca -Aufnahme, die DNS-Synthese und damit die Bildung des CaBP. $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ zeigte bei diesen Versuchen auch einen positiven Effekt auf die P-Absorption und das bei Organkulturen des Hühnerileums, obwohl nach dem heutigen Wissen außerhalb der Niere keine Transformation zu $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ möglich ist. Ähnliches beobachtete

CORRADINO (1973b) hinsichtlich der Ca-Absorption aus dem Darm. $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ stimulierte die ^{45}Ca -Aufnahme, aber nicht die Bildung des CaBP. STEELE et al. (1975) stellten außerdem fest, daß $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ die Reabsorption von Phosphat aus den renalen Tubuli fördert, im Gegensatz zum Parathormon, das dessen Rückresorption vermindert und damit zu einer Phosphaturie führt.

2.3 Regulation des Vitamin D-Stoffwechsels

Calcitonin (GALANTE et al., 1972), $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ selbst (LARKINS et al., 1974), Prolactin (SPANOS et al., 1976) und Östrogen und Testosteron (TANAKA et al., 1976) beeinflussen unter anderem die $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -1-Hydroxylase in der Niere und damit die Produktion des $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Die drei wichtigsten Faktoren aber sind das Parathormon (GARABEDIAN et al., 1972), die Menge an Calcium in der Diät (BOYLE et al., 1971) und der Phosphorgehalt der Diät (TANAKA und DeLUCA, 1973).

Der Plasmaspiegel des $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ steigt bei niedrigem Ca- oder P-Gehalt der Diät. Allerdings geschieht dies nach HAUSSLER et al. (1976b) auf unterschiedliche Weise. Sowohl nicht operierte als auch Ratten mit operativ entfernter Nebenschilddrüse (TPTX) zeigen bei einer P-Mangeldiät eine Erhöhung des $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ im Plasma. Daraus wird deutlich, daß weder Parathormon (PTH) noch Calcitonin einen Einfluß auf den Anstieg des $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bei einer P-Mangeldiät besitzen. Schon TANAKA und DeLUCA (1973) weisen auf die Möglichkeit hin, daß eine Hypophosphatämie verantwortlich für die Erhöhung der $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ -Konzentration im Blut ist. Ein niedriger P-Plasmaspiegel wirkt direkt und erhöht $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ im Blut. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ bewirkt auf der einen Seite eine vermehrte Absorption des Calciums und Phosphats aus dem Darm und auf der anderen Seite die Freisetzung beider aus den Knochen. Die daraus resultierende Erhöhung des Ca-Plasmaspiegels führt zu einer Unterdrückung der PTH-Sekretion, die zusammen mit der Hyperkalzämie einen Anstieg des Calciums im Urin, aber eine Verringerung der Phosphatex-

kretion zur Folge hat. Das Ergebnis einer Hypophosphatämie ist der selektive Anstieg des P-Plasmaspiegels.

Bei Hypokalzämie zeigen TPTX-Ratten nicht den gleich hohen Anstieg des $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ wie nicht operierte Tiere. Da nach HARGIS et al. (1974) bei hypokalzämischen Tieren der PTH-Gehalt im Blut um das 3fache erhöht ist, besteht die Möglichkeit, daß das erhöhte PTH bei diesen Tieren den $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel anhebt. Die normale, im Blut zirkulierende PTH-Menge scheint den $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel aufrechtzuerhalten, da dessen Konzentration bei normokalzämischen TPTX-Ratten absinkt. Diese Erkenntnisse stimmen mit der Entdeckung GARABEDIANS et al. (1972) überein, daß PTH ein wichtiger Regulator des $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist. Das Calcium beeinflusst auch selbst den $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel, da TPTX-Ratten bei Hypokalzämie einen Anstieg des $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ gegenüber normokalzämischen TPTX-Ratten zeigen. Nicht operierte Tiere entwickeln bei einer Ca-Mangeldiät nur eine leichte Hypokalzämie, daher erscheint es möglich, daß PTH das Ca-Plasma-defizit durch Mobilisierung des Calciums aus den Knochen behebt. Der $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel steigt trotz dieser leichten Hypokalzämie stark an; dies läßt einen größeren Einfluß des PTH als des Ca-Blutspiegels auf $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermuten. Hypokalzämie bewirkt über eine Verstärkung der PTH-Sekretion eine Erhöhung des $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Blut. $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt dann auf den Darm und die Knochen und erhöht so den Ca- und P-Plasmaspiegel. PTH setzt wie $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ Calcium und Phosphat aus den Knochen frei. Es bewirkt außerdem in der Niere eine Phosphaturie. Daher ist das Ergebnis einer ursprünglichen Hypokalzämie ein selektiver Anstieg des Ca-Plasmaspiegels.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

Eine Hypophosphatämie scheint eine direkte Wirkung zu besitzen, während eine Hypokalzämie daneben die PTH-Sekretion aktiviert und so eine Phosphatämie, die $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ allein hervorrufen würde, verhindert. Bei dem Ausgleich eines Ca-

Mangels wird das überschüssige Phosphat und bei dem Ausgleich eines P-Mangels das überschüssige Calcium über die Niere ausgeschieden. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle des PTH in der zweiseitigen Kontrolle des Ca- und P-Plasmaspiegels durch $1,25-(OH)_2D_3$ hin. In welcher Weise die unterschiedlichen Faktoren auf die Niere wirken und so zu einer vermehrten Bildung des $1,25-(OH)_2D_3$ führen, bleibt zu untersuchen.

3. Vitamin D-Bestimmungsmethoden

3.1 Chemische und physikalische Methoden

Das Hauptproblem dieser Methoden liegt darin, daß das Vitamin D frei von störenden Begleitstoffen sein muß, die besonders in biologischen Proben (z.B. Lebens- und Futtermittel) oder pharmazeutischen Präparaten vorkommen. Daher müssen Stoffe, wie Vitamin A und E, die Phytosterine, die Isomeren des Vitamin D, Fette und Eiweißkörper vor der eigentlichen Messung abgetrennt werden. Es bedarf einiger Reinigungsschritte, um diese bei der Messung störenden Begleitstoffe entfernen zu können. Häufig wird als erstes eine alkalische Verseifung durchgeführt, die verseifbare Substanzen wie Fette abtrennt. Als nächstes können im unverseifbaren Rest die Sterine mit Digitonin ausgefällt werden. Die folgenden Schritte dienen hauptsächlich dazu, Vitamin A und E neben den Isomeren des Vitamin D zu entfernen. Die Säulenchromatographie mit den verschiedensten Füllstoffen (z.B. Aluminiumoxid, Kieselgel) wird hauptsächlich zur Abtrennung von Vitamin A und E benützt. Mit ihr lassen sich aber auch, wie zum Beispiel von MAWER und BACKHOUSE (1969) beschrieben, die Metaboliten des Vitamin D_3 unterscheiden. Für diese Zwecke hat sich die Dünnschichtchromatographie als besser erwiesen, die PINELLI et al. (1969) dazu benutzten, Vitamin D von Cholesterin zu differenzieren.

In den letzten Jahren gewinnt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an Bedeutung. JONES und DeLUCA (1975) verwendeten sie, um die Metaboliten des Vitamin D₂ und D₃ zu trennen. RÜCKEMANN und RANFFT (1977) beschreiben eine Methode, die über die HPLC die Bestimmung von Vitamin D in Vitaminkonzentraten, Vitaminmischungen und Mineralfuttermitteln ermöglicht. Aufgrund ihrer genauen Abtrennung interferierender Substanzen wird sie heute immer häufiger zur Reinigung der Untersuchungsproben benützt. Diese Reinigungsschritte erfordern einerseits einen großen Arbeitsaufwand und führen andererseits zu Vitamin D-Verlusten, sei es durch teilweise Zersetzung oder durch Zurückbleiben in eluierten Fraktionen. Diese so vorgereinigte Probe kann dann zum Beispiel über die

Farbreaktion mit Antimontrichlorid, die von BROCKMANN und CHEN (1936) entwickelt wurde, nachgewiesen werden. Der Test beruht darauf, daß die Vitamine D₂ und D₃ mit Antimontrichlorid in Chloroform einen orangegelben Farbkomplex bilden, dessen Extinktion bei 500 nm (temperaturabhängig) mit dem Photometer bestimmt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht über die

UV-Spektrophotometrie, die von BEKEMEIER und PFENNIGSDORF (1974) für die Vitamin D₃-Bestimmung kurz beschrieben wurde. Sie beruht darauf, daß die drei konjugierten Doppelbindungen des Ergocalciferols und Cholecalciferols in spektrophotometrischen Bestimmungen bei 264,5 nm ein Absorptionsmaximum zeigen, wenn sie in alkoholischer Lösung vorliegen. Mit Hilfe der IR-Spektrophotometrie gelang es MORRIS et al. (1962) erstmals, mit einer nichtbiologischen Methode Vitamin D₂ und D₃ zu unterscheiden. ZIFFER et al. (1960) zeigte die Möglichkeit auf, über die

Gaschromatographie Vitamin D bestimmen zu können. Der Gaschromatograph kann mit dem Vitamin D selbst, mit seiner Äther-

oder Esterform beschickt werden. Dabei entstehen aus dem Vitamin D₂ und D₃ beim Verdampfen (180-200°C) je zwei Isomere, nämlich Pyro- und Isopyrocalciferol. Diese beiden Isomeren trennen nicht sauber auf und erschweren somit die Auswertung. MURRAY et al. (1966) beschrieben eine Isomerisierung des Vitamin D₂ und D₃ mit Antimontrichlorid zu Isocalciferol, das bei der Gaschromatographie nicht mehr in zwei Peaks zerfällt, sondern für Vitamin D₂ und D₃ nur noch je einen Peak ergibt. Diese beiden sind deutlich voneinander getrennt, so daß es möglich ist, Vitamin D₂ als "inneren Standard" für die Bestimmung von Vitamin D₃ und umgekehrt, zu verwenden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Vitamin D₂ und D₃ über ihre Retentionszeiten zu unterscheiden. Basierend auf diesen Grundlagen entwickelten HOMMES und DEKKER (1973) ein Verfahren, das die Vitamin D-Bestimmung im Lebertran des Kabeljau, in pharmazeutischen und veterinär-medizinischen Präparationen erlaubt, obwohl sie viele störende Begleitstoffe enthalten.

3.2 Biologische Methoden der Vitamin D-Bestimmung

Die biologischen Methoden stammen aus einer früheren Zeit als die chemisch-physikalischen. Nach wie vor liegen ihre großen Vorteile darin, auf Reinigungsschritte, die Vitamin D-Verluste bewirken, verzichten zu können. Die biologischen Tests geben zum Beispiel die Wirkungen eines getesteten Futtermittels als Ganzes auf die Tiere wieder und nicht nur den Vitamin D- Gehalt. Daher erklären sich auch die unterschiedlichen Ergebnisse einer Untersuchungssubstanz zwischen biologischen und nichtbiologischen Verfahren.

Die meisten biologischen Vitamin D-Bestimmungsverfahren beruhen auf der Erzeugung einer Rachitis, die dann durch Vitamin D-Gaben geheilt wird. Prinzipiell kann eine Rachitis nur an jungen wachsenden Tieren erzeugt werden, die sich in

der Phase des intensiven Skelettwachstums befinden. Ihr Bedarf an Calcium und Phosphat ist besonders hoch. Die Rachitis wird durch Vitamin D-freie Diäten hervorgerufen. Bei Ratten muß auch ein hoher Ca-P-Quotient vorliegen. Eine gebräuchliche Diät ist die von Mc COLLUM et al. (1922). Sie hat einen Ca-P-Quotienten von 4 (1,2% Ca; 0,217% P). Ein niedriger P-Gehalt in der Diät stimuliert die vermehrte Bildung des $1,25-(OH)_2D_3$ und bewirkt damit eine rasche Erschöpfung der Vitamin D-Vorräte. Als Folge davon kommt es zu einer Hypokalzämie, die eine vermehrte Parathormonsekretion hervorruft. Das PTH hält dann über die Mobilisierung von Calcium und Phosphat aus den Knochen einerseits und über eine Phosphaturie andererseits eine Normokalzämie aufrecht. Dieser ständige Abbau von Calcium und Phosphat aus den Knochen führt schließlich zu einer Rachitis. Viele der heute verwendeten Diäten weisen oft nicht einen so hohen Ca-P-Quotienten auf. Sie führen aber trotzdem auch zu einer Rachitis, da sie entweder von vornherein nur ganz geringe Ca-Mengen oder sehr wenig Phosphat enthalten. Diese niedrigen Ca- und P-Gehalte der Diät bewirken beide über die vermehrte $1,25-(OH)_2D_3$ -Bildung eine raschere Depletion und eine frühe Erhöhung der PTH-Sekretion.

REMP und MARSHALL (1938) stellten fest, daß ein biologischer Test mit Ratten und Küken über die Beurteilung der Rachitisheilung eine Unterscheidung zwischen Vitamin D_2 und D_3 ermöglicht, da Vitamin D_2 ungefähr nur 3 % der Wirksamkeit von Vitamin D_3 bei den Küken zeigte. Die Ratten dagegen ließen keine Unterschiede erkennen. KARG (1953) wies jedoch nach, daß auch für die Ratte das Vitamin D_3 wirksamer ist als Vitamin D_2 , und zwar um etwa ein Drittel. Trotzdem ist eine Internationale Einheit (I.E.) für beide zu je $0,025 \mu g$ festgelegt.

Den Parameter für die antirachitische Wirkung stellt bei fast allen biologischen Testen die Knochenkalzifizierung junger Ratten und Hühner dar. Als weitere Kriterien sind das Eischalentrockengewicht, die Absorptionsrate von ^{45}Ca aus

dem Darm und der Ca- oder P-Plasmaspiegel zu nennen.

Es lassen sich zwei Arten unterscheiden, und zwar auf der einen Seite

der kurative oder therapeutische Test. Hier wird die Menge der untersuchten Probe bestimmt, die eine zuvor erzeugte Avitaminose gerade aufzuheben vermag. Auf der anderen Seite gibt es

den prophylaktischen Test. Hier wird die Dosis bestimmt, die eine Avitaminose noch verhindert.

Die gebräuchlichen biologischen Teste zur Vitamin D-Bestimmung sollen kurz abgehandelt werden. Der von BLISS und GYÖRGY (1951) beschriebene und beurteilte

Line-Test ist der älteste, meist kurativ durchgeführte Test. Nach einer Depletionsperiode erhalten die Ratten über 8 - 10 Tage Vitamin D-Applikationen. Anschließend werden sie getötet und die Schnittfläche eines proximalen Femurendes oder die Ulna oder der Radius mit Silbernitrat getränkt. In der Verkalkungszone bildet sich Silberphosphat, das nach der Belichtung metallisches Silber abscheidet und die Kalkränder ("Line") schwarz färbt. Deren Ausdehnung und Intensität gilt als Maß der unter Vitamin D-Einfluß abgelaufenen Rachitishheilung (Knochenkalzifizierung). Von BLUNK (1951) und KARG (1953) wurde

die Röntgenmethode soweit verfeinert, daß sie eine quantitative Aussage zuläßt. Die Störung der enchondralen Ossifikation im Epiphysenfugenknorpel des proximalen Tibiaabschnittes wird röntgenologisch erfaßt und mit einem eigens entwickelten Verfahren gemessen. Bei der prophylaktischen Ausführung erhalten die Ratten eine rachitogene Diät und gleichzeitig Vitamin D-Gaben. Hier ist nur eine Messung am Ende der Versuchsperiode nötig. Bei der kurativen Ausführung werden die Tiere nach einer Depletionsperiode erstmals ge-

röntgt und ein zweites Mal nach den 8-10tägigen Vitamin D-Applikationen. Ein Vergleich beider Aufnahmen zeigt den Vitamin D-Effekt. Der von BEKEMEIER und PFENNIGSDORF (1974) beschriebene

Knochenaschetest ist auch schon sehr lange in vielen Modifikationen im Gebrauch. Er benützt als Maß für die Vitamin D-Wirksamkeit den Aschegehalt entfetteter Knochen (Humerus und Femur; oder Tibia, Fibula und Femur; neuerdings auch einer Zehe). Gesunde Tiere weisen einen prozentualen Anteil der Asche an der Knochentrockensubstanz von etwa 50 % auf. Mit sinkendem Anteil nimmt die Schwere der Erkrankung (Rachitis) zu.

Der Radiophosphortest wurde von SNYDER et al. (1951) entwickelt. Bei diesem therapeutischen Test wird die Radioaktivität des in den Knochen eingebauten ^{32}P gemessen. Die bei der Mineralisation des Skeletts aufgenommene ^{32}P -Menge und damit die Höhe der Radioaktivität ist proportional mit den verabreichten Vitamin D-Dosierungen. Ratten erhalten eine rachitogene Diät, danach eine einmalige Vitamin D-Gabe und später ^{32}P intraperitonäal injiziert. 10 Tage danach werden die Vorderpfoten einer Ratte auf das Fenster des Geigerzählers gelegt und die Radioaktivität bestimmt.

Der Wachteleischalentest, der von BAUMEISTER (1972) gearbeitet wurde, beruht darauf, daß bei der Wachtelhenne schon nach kurzer Vitamin D_3 -Depletion die Legeleistung und der Ca-Gehalt der Eischale der dann erfolgenden Vitamin D_3 -Zufuhr proportional sind. Die durchschnittliche Ca-Ausscheidung über die Eischale kann nach ZUCKER und GROPP (1968) als Meßkriterium für verschiedene Vitamin D_3 -Konzentrationen herangezogen werden. Da der Ca-Anteil bei unterschiedlichen Schalengewichten ein nahezu konstantes Verhältnis zeigt, bietet sich das Eischalentrockengewicht als Parameter der Vitamin D_3 -Wirkung an.

Im Anschluß an die Depletionsperiode erhalten die Wachteln verschiedene Testrationen, dabei wurde berücksichtigt, daß nach HOFMANN (1971) in dem Bereich von 80 - 300 I.E. Vitamin D₃/kg Futter eine lineare Beziehung zwischen Vitamin D₃-Angebot und Eischalenkalzifizierung besteht. Die Standardkonzentrationen betragen 80, 140 und 200 I.E. Vitamin D₃/kg Futter. Beide werden im Anschluß an die Depletion verfüttert. In der Meßperiode wird das Eischalentrockengewicht festgestellt.

Der Calcium-Akkumulationstest, von SCHACHTER et al. (1961) entwickelt, ist ein kurativer Test. Über die vom Duodenum aufgenommene Menge an ⁴⁵Ca läßt sich die Höhe der Vitamin D₃-Gabe bestimmen. Nach einer Depletionsperiode mit einer ausreichenden Mineralzufuhr werden die Ratten 48 h nach der einmaligen Vitamin D₃-Gabe getötet, das Duodenum entnommen und mit ⁴⁵Ca inkubiert.

Vitamin D-Bestimmung über die Ca- oder P-Serumwerte

Besonders in den letzten Jahren wurde der Nachweis der Vitamin D- Wirkungen kalzinogener Pflanzen, wie Solanum malacoxylon oder Trisetum flavescens, über die Ca- oder P-Serumwerte versucht.

CAMPOS et al. (1973) untersuchten den Effekt von Solanum malacoxylon (SM) bei Ratten mit operativ entfernter Nebenschilddrüse (TPTX) und bei rachitischen Tieren. Dabei erhielten die Ratten, denen die Nebenschilddrüse entfernt werden sollte, eine Diät mit hohem Mineralstoffgehalt. Nach der Scheinoperation oder der Entfernung der Nebenschilddrüse wurde ihnen ein wasserlöslicher Extrakt (SM) täglich subcutan appliziert. Die andere Gruppe erhielt eine rachitogene und die letzte Woche eine völlig Ca-freie Diät. Danach bekamen auch sie täglich SM-Gaben. Über die "Serumphosphatwerte" wurden die Wirkungen des SM bei TPTX- und rachitischen Ratten beurteilt.

HUMPHREYS (1973) studierte das aktive Prinzip des SM an Kaninchen, die eine normale Diät erhielten. Sie bekamen oral in Öl gelöst entweder 500 µg Vitamin D₃ oder über verschiedene Extraktionsverfahren Mengen, die 40 g TS Solanum malacoxylon entsprachen. Der anorganische P-Gehalt des Serums wurde am Tage der Gabe und an den nächsten 5 Tagen bestimmt.

WALLING und KIMBERG (1975) untersuchten die Ca-Absorption im Darm und Ca- und P-Gehalte des Blutes nach Solanum glaucophyllum-Gaben bei Vitamin D-Mangelratten, die nephrektomiert wurden. Sie bekamen eine Vitamin D-freie Diät (0,8 % Ca; 0,4 % P) und vor der Tötung eine Diät, die 1 % Ca und 0,02 % P enthielt. Nach der Scheinoperation oder Nephrektomie wurde ihnen Solanum glaucophyllum (≈ 250 mg TS) intraperitonäal injiziert. Anhand der Ca- und P-Gehalte im Serum konnte neben der Ca-Absorption im Darm die Wirkung von Solanum gl. beurteilt werden.

ZUCKER et al. (1977) entwickelten einen Rattentest, um die kalzinogene Wirksubstanz des Goldhafers nachweisen zu können. Junge Sprague-Dawley-Ratten wurden dazu 3 Wochen mit einer Vitamin D-freien Diät gefüttert, die einen niedrigen Ca-Gehalt aufwies. Gleichzeitig mit dem Umsetzen auf das Testfutter (hohen Ca-Gehalt) bekamen die Tiere Vitamin D oder Goldhaferextrakte entweder über das Futter oder die Schlundsonde. Am dritten Tag nach der Wirkstoffgabe erfolgten dann aus dem retrobulbären Gefäßplexus die Blutentnahme und anschließend die Serumphosphatbestimmung.

3.3 Vergleichende Betrachtung der biologischen Teste

An dieser Stelle soll nur kurz auf die Vor- und Nachteile der zuvor aufgeführten Teste eingegangen werden.

Der Line- und Knochenaschetest haben den großen Nachteil, daß die Ausgangslage der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn nicht beurteilbar ist, da beide Untersuchungsparameter erst nach der Tötung festgestellt werden können. Um diesen Nachteil auszugleichen, bedarf es einer großen Tierzahl. Dies erweist sich bei beiden Testen wegen ihrer zeitaufwendigen Untersuchungen als ungünstig. Trotzdem gilt besonders der Knochenaschentest als sehr objektiv, da die Trockensubstanz- und Aschebestimmung leicht und genau durchzuführen sind.

Die Röntgenmethode hat dagegen den großen Vorteil, ständig eine Prüfung des Zustandes vor und während des Versuches durchführen zu können. Hier ist es also möglich, den Ausgangsstatus am Versuchstier, und nicht wie bei vielen Testen über Kontrolltiere, beurteilen zu können. Es werden daher weniger Tiere für exakte Ergebnisse benötigt; dies verringert den zeitlichen Aufwand. Als Nachteil müssen die aufwendigen Apparaturen (Röntgengerät, Entwicklung der Aufnahme), die räumlichen Anforderungen (Röntgenverordnung) und der Bedarf an speziell ausgebildetem Personal genannt werden. Die Auswertung der Röntgenbilder ist wie beim Line-Test mit einem subjektiven Fehler belastet.

Der Radiophosphor- und Calcium-Akkumulationstest besitzen eine verhältnismäßig komplizierte Versuchsanordnung, wenn auch die eigentliche Messung sehr einfach und schnell vor sich geht. Der Calcium-Akkumulationstest weist darüber hinaus eine ziemlich lange Versuchsdauer auf. Beide arbeiten mit radioaktivem Material und erfordern daher zahlreiche Sicherheitsvorkehrungen (Strahlenschutzverordnung).

Der Wachteleischalentest hat eine lange Versuchsdauer, wenn auch der Arbeitsaufwand außerhalb der Testperiode gering ist. Das Kriterium "Eischalentrockengewicht" stellt eine günstige Möglichkeit dar, die Vitamin D-Wirkung bestimmen zu können. Die Wiederverwendungsmöglichkeit der Wachtelhennen muß auch als günstig beurteilt werden. Er ist besonders zur Gehaltsbestimmung von Vitamin D₃ in Futter- und Lebensmitteln geeignet.

Die Teste, die über die Ca- und P-Plasmaspiegel die Wirkung kalzinogener Pflanzen beurteilen, wurden nicht, wie die anderen Teste, entwickelt, um eine quantitative Aussage zu ermöglichen. Erwähnung fanden diese Teste, da sie die Möglichkeit einer Beurteilung der Vitamin D₃-Wirkung über die Ca- und P-Blutspiegel aufzeigen.

4. Problemstellung

Obwohl die meisten biologischen Teste mit der Zeit immer mehr verfeinert wurden, blieben ihnen doch die in der Versuchsanordnung liegenden Nachteile zum Teil erhalten. Die erfolgversprechende Anwendung des Serumphosphates zum Nachweis der Wirkung kalzinogener Pflanzen im Vergleich zu Vitamin D₃ ließ den Gedanken aufkommen, ob es nicht möglich wäre, auf dieser Grundlage einen neuen biologischen Test zu entwickeln. Er sollte einfach durchführbar sein und in einem möglichst großen Dosisbereich eine Aussage gestatten. Der von ZUCKER et al. (1977) entwickelte Rattentest diene als Basis für dieses Vorhaben.

Zunächst war zu klären, wie das Vitamin D appliziert werden sollte, zum Beispiel über die Schlundsonde. Dann mußte die Dauer der Applikation gefunden werden. Bei einer Gabe über die Schlundsonde war die Tauglichkeit verschiedener Träger (z.B. Alkohol, Öl) zu überprüfen, besonders im Hinblick auf die Beeinflussung des Untersuchungsparameters (Serumphosphat). Der beste Zeitpunkt für die Blutentnahme und anschließende P-Bestimmung mußte gefunden werden. Es war zu untersuchen, ob sich der Futterverzehr während der eigentlichen Versuchsperiode auf die Höhe des Serumphosphats auswirkt. Der Linearitätsbereich dieses Testes zwischen den Serumphosphatwerten und den verabreichten Vitamin D- Dosierungen mußte bestimmt werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob auch über die Serumcalciumwerte eine quantitative Aussage möglich ist und sie sich mit den Serumphosphatwerten vergleichen lassen.

Diese grob umrissenen Fragen bildeten das Gerüst für die anschließend beschriebenen Untersuchungen.

5. Eigene Untersuchungen

5.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen

40 g schwere, männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden von einer Firma* bezogen. Nach der 3wöchigen Depletionsperiode, in der die Tiere zu zweit aufwuchsen, wurden sie einzeln in Plastikkkäfige umgesetzt. Die Tiere der verschiedenen Wirkstoffgruppen waren nach dem Grundprinzip der Randomisierung verteilt. Das Lichtprogramm wurde so gewählt, daß die Ratten über mehrere Neonröhren von 6 - 18 Uhr Licht erhielten. Ein Thermostat hielt die Temperatur konstant auf 26°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 %. Der Raum stand unter Zwangsentlüftung.

Entscheidend für diesen Test sind neben den gleichbleibenden Umweltbedingungen die Verhinderung jeder Kontamination mit Vitamin D.

5.2 Fütterung

Die Fütterung während der ersten drei Wochen soll zu einer Depletion an Vitamin D und zu einer Rachitis führen. Die Depletion wird durch einen niedrigen Ca- und P-Gehalt erreicht, der die vermehrte Bildung des $1,25-(OH)_2D_3$ anregt und so die Vitamin D-Speicher erschöpft. Schließlich sinkt der Ca-Blutspiegel; dies bewirkt die Freisetzung von Parathormon. Das Parathormon reguliert den Blutspiegel dadurch, daß es aus den Knochen Calcium und Phosphat freisetzt. Die Folge dieser Regulation ist eine Rachitis.

Im Anschluß daran erhalten die Tiere während der eigentlichen Versuchsperiode ein Futter mit einem sehr hohen Ca-Gehalt, das ein Sinken der Parathormonsekretion und eine Phosphat-

* Mus Rattus GmbH, 8011 Brunnthal bei München

fällung im Darm bewirkt und so zu einer "Hypophosphatämie" führt, die die Grundvoraussetzung für diesen Test darstellt.

Die Sprague-Dawley-Ratten erhielten daher in allen später beschriebenen Versuchen während der ersten zwei Wochen eine Vitamin D-freie Diät (2a) mit einem Ca-P-Quotienten von 0,72. In der 3. Woche wurden die Tiere mit einer Vitamin D-freien Diät (2b) gefüttert, die einen Ca-P-Quotienten von 0,3 aufwies. Nach dieser 3 wöchigen Depletionsperiode bekamen alle Ratten für die eigentliche Versuchsdauer ein Vitamin D-freies Testfutter (2) mit einem Ca-P-Quotienten von 8,62. In den nachfolgenden Tabellen sind die drei Futtertypen (2-2b) und ihre Mineralstoff- und Vitaminvormischungen dargestellt.

Die beiden Vordiäten führen, wie oben schon kurz erwähnt, zu einer Depletion und Rachitis. Außerdem sollen sie aber ein rasches Wachstum ermöglichen. Dazu bedarf es besonders bei so jungen Tieren eines hohen Eiweißgehaltes im Futter, der aber gleichzeitig den P-Gehalt der Diät erhöht. Die Ergänzung mit Methionin und Lysin dagegen belastet die Diät nicht mit zusätzlichem Phosphat und erhöht darüber hinaus die biologische Wertigkeit des Eiweißes. Die Maisstärke wurde zugesetzt, da sie völlig P-frei ist. Daneben stellt sie ein leicht verdauliches Nahrungsmittel (Kohlehydrate) dar. Das Sojaöl soll hauptsächlich das Futter binden, liefert aber auch essentielle Fettsäuren.

Die Mineral- und Vitaminzusätze decken den Bedarf der Tiere und schaffen auch in dieser Hinsicht möglichst günstige Bedingungen für das Wachstum. Die Vordiät (2a) besitzt einen höheren Ca-Gehalt als 2b, damit die Tiere rasch wachsen. Der extrem niedrige Ca-Gehalt der Vordiät (2b) soll dagegen über eine hohe Parathormonausschüttung die Rachitis verstärken; das Wachstum tritt hier etwas in den Hintergrund.

Bei der Vitaminvormischung wurde der Vitamin A-undE-Gehalt so niedrig gewählt, um die Möglichkeit auch nur geringfügiger Kontamination mit Vitamin D, zum Beispiel in der Konfektionierung der Vitaminkonzentrate, auszuschließen.

Tabelle 2

Vitamin D-freie Futterrationen

Rationszusammensetzungen auf 1000g berechnet:

	1. Vordiät 2a 1.u.2.Wo	2. Vordiät 2b 3.Wo	Testfutter 2 65 h
Sojaschrot	300	300	300
Maisschrot	200	200	200
Mineralsalz- I2a 30 I2b 30 I2 30 mischung			
Vitaminvor- 10 10 10 mischung			
Sojaöl	20	20	20
DL-Methionin	3	3	3
L-Lysin-HCL	2	2	2
CaCO ₃	---	---	92,5
Maisstärke (Si- 435 435 342,5 rona)			
	1000g	1000g	1000g
Gesamtprotein	157g	157g	157g
Ca-Gehalt	3,97 g	0,95g	40,97g
P-Gehalt	5,49 g	3,15g	4,74g

Tabelle 3,

Mineralsalzmischungen auf 1000g Futter bezogen:

	1. Vordiät	2. Vordiät	Testfutter
	2a	2b	2
$\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	13	---	13
K_2HPO_4 (sicc)	1	1	---
KCL	4	4	7
Na_2HPO_4 (sicc)	2	2	---
NaCL	4	4	4
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	5	5	5
Fe-III-citrat	0,45	0,45	0,45
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,03	0,03	0,03
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,4	0,4	0,4
ZnCO_3	0,1	0,1	0,1
KJ	0,01	0,01	0,01
NaF	0,01	0,01	0,01
Maisstärke (Sirona)	---	13	---
	30g	30g	30g

Tabelle 4

Vitaminvormischung auf 1000g Futter bezogen:

Vitamin A	1000 I.E.	Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin E	20 mg	Nikotinsäure	50 mg
Vitamin K ₃	0,5 mg	Cholinchlorid	2.000 mg
Thiamin-HCL (B ₁)	20 mg	Folsäure	2 mg
Riboflavin (B ₂)	20 mg	Biotin	200 µg
Pyridoxin-HCL (B ₆)	10 mg	meso-Inosit	100 mg
Vitamin B ₁₂	30 µg	Ascorbinsäure	20 mg
		p-Aminobenzoesäure	100 mg

mit Maisstärke (Sirona) ad 10g

5.3 Herstellung der verschiedenen Rationen

Zur Erreichung der Vitamin D_3 -Konzentrationen wurde der Vitamin D_3 -Standard von MERCK impliziert. Dieses reine Vitamin D-Präparat enthält in 1g 40.000.000. I.E. Vitamin D_3 . Um zum Beispiel auf eine Verdünnung von 2 I.E. Vitamin D_3 /0,2 ml Olivenöl zu kommen, mußte folgendermaßen verfahren werden:

10 mg des Merckstandards wurden in 100 ml Petroläther gelöst und 1 ml davon erneut mit Petroläther auf 100 ml aufgefüllt. 2,5 ml davon wurden in einem kleinen Birnenkolben mit ungefähr 2 ml Olivenöl pipettiert und der Petroläther über ein Wasserbad mit 50°C und einer Wasserstrahlpumpe verdampft. Anschließend wurde das nun in Olivenöl gelöste Vitamin D_3 in einen 10 ml Meßkolben gefüllt und Olivenöl bis zur 10 ml-Meßmarke dazupipettiert. In diesem 10 ml waren 100 I.E. Vitamin D_3 , also in 0,2 ml die geforderten 2 I.E. Bei Verdünnungen in 96 %-Alkohol wurden 10 mg Merckstandard anstatt in Petroläther gleich in Alkohol gelöst, ansonsten war die Prozedur bis auf das Eindampfen, das entfiel, dieselbe wie vorhin aufgeführt. Verdünnungen von 1,25-(OH) $_2D_3$ wurden in 96 %-Alkohol nach dem gleichen Verfahren hergestellt.

Als Schlundsonde für die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen diente eine Hauptner Tuberkulinspritze nach Dr. GÖTZE mit einer Knopfkanüle.

5.4 Blutgewinnung

Die Ratten wurden in einer Glasglocke mit gereinigtem Äther narkotisiert. Die linke Hand hielt das auf dem Tisch liegende Tier im Kopf- und Nackenbereich fest und übte einen Druck aus, so daß der Bulbus eines Auges etwas hervortrat. Die rechte Hand öffnete durch ein Mikrohämatokritstäbchen unter drehenden Bewegungen vom temporalen Lidwinkel her den retro-

bulbären Gefäßplexus. Das Blut wurde mit kleinen Reaktionsgefäßen von EPPENDORF (1,5 ml) aufgefangen, die ein Glasstäbchen zur Fibrinablagerung enthielten. Nach ungefähr drei Minuten wurden die Gefäße verschlossen und zur Serumgewinnung bei 3600 U/min zwei Minuten lang zentrifugiert.

5.5 Phosphorbestimmung (anorg. P)

Sie beruht auf der "Molybdat-Vanadat-Reaktion" (Testkombination von BOEHRINGER MANNHEIM Nr. 124 974). Bei ihr entsteht durch den Einbau des Phosphors in die Isopolysäuren des Vanadiums und Molybdäns eine Heteropolysäure, die unter bestimmten Reaktionsbedingungen gelb gefärbt ist.

Zur Doppelbestimmung wurden je 0,1 ml Serum mit je 2 ml 0,6 N-Trichloressigsäure versetzt, 10 min stehen gelassen und anschließend bei 3600 U/min 10 min lang zentrifugiert. Die Trichloressigsäure führt zu einer Enteiweißung, bei der unter anderem organisches Phosphat ausgefällt wird. Zu 1 ml der abpipettierten Flüssigkeit wurde je 1 ml Molybdat und Vanadat hinzugefügt. Dieses Gemisch blieb wieder 10 min stehen und wurde danach noch kurz zentrifugiert. Für die Messung wird neben einer Nulllösung, die aus 1 ml Trichloressigsäure und je 1 ml Molybdat und Vanadat besteht, ein P-Standard benötigt, der 0,5 mg P/100 ml enthält. Die Extinktion der Gelbfärbung wurde bei 366 nm gemessen und der anorganische Phosphorgehalt nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}} \times 10,5 = \text{mg P/100 ml Serum}$$

5. 6 Statistische Methoden

Die erste Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Berechnung der Mittelwerte der Serumphosphatwerte jeder Gruppe; darüber hinaus wurde stets deren Standardabweichung errechnet.

Diese Ergebnisse sollten nun graphisch dargestellt werden. Die Transformation der x-Werte (Vitamin D₃-Konzentration) mit Hilfe des Logarithmus erwies sich als eine geeignete Maßnahme, um eine lineare Darstellung zu ermöglichen, daher wurden die erhaltenen Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen auf ein Papier mit einer logarithmisch unterteilten Abszisse aufgetragen. Diese Darstellung bildete bei allen Versuchen die Grundlage für die Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse und für die weitere Versuchsplanung. Die Versuche, mit deren Hilfe eine geeignete Versuchsanordnung gefunden werden sollte, wurden nicht weiter statistisch ausgewertet, im Gegensatz zu denen, die Aufschluß über den Dosisbereich dieses Testes geben sollten. Für deren Auswertung waren die weiteren jetzt beschriebenen Schritte notwendig. Die Anleitungen zu den Berechnungen stammen aus dem Buch "Statistische Auswertungsmethoden" von SACHS (1969).

Zuerst wurden die einzelnen Gruppen auf Normalverteilung und der jeweilige Versuch auf Varianzhomogenität untersucht. Die Normalverteilung berechnet sich aus der Differenz des größten und kleinsten Wertes einer Gruppe geteilt durch die Standardabweichung, die Varianzhomogenität aus dem Quotienten der größten und kleinsten Varianz. Da bei den Versuchen vereinzelt Gruppen nicht normal verteilt waren, Varianzhomogenität lag bei allen Versuchen vor, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN berechnet, und zwar nach folgenden Formeln:

$$r_s = 1 - \frac{\sum D^2}{n(n^2-1)} \quad \text{und für } n > 30$$

$$\text{nach } z = |r_s| \times \sqrt{n-1}.$$

D bedeutet dabei die Differenz der einzelnen Rangzahlen ($x_1 - y_1$ usw.). Die Errechnung der Regressionsgeraden $y = a + bx$, wobei y die Serumphosphatwerte, x die logarithmierten Vitamin D₃-Dosierungen darstellt, ermöglicht eine Überprüfung der Linearität der Regression. Dabei wurde das Verhältnis der Abweichung der Mittelwerte von der Regressionsgeraden zur Abweichung der y-Werte von ihrem Gruppenmittelwert gebildet. Erreicht oder übersteigt dieses Verhältnis die Signifikanzschranke, so liegt keine Linearität vor. Die Feststellung der Linearität erlaubte die Beurteilung weiterer Faktoren. Als nächstes wurden die Vertrauensgrenzen für den Regressionskoeffizienten, für den Achsenabschnitt der Regressionsgeraden und darüber hinaus für die Restvarianz bestimmt. Sie geben einen Anhaltspunkt, wie exakt die Regressionsgerade die Werte wiedergibt. Genauer läßt sich dies noch über die Berechnung der Vertrauensgrenzen der Regressionsgeraden darstellen. Je enger sie sind, desto größer ist ihre Aussagefähigkeit.

Bei der graphischen Darstellung der Versuche, die den Bereich des Testes anzeigen sollen, wurden neben der Regressionsgeraden ihre beiden 95 %-Vertrauensbänder und der 95 %-Vertrauensbereich aller Beobachtungen um die Regressionsgerade eingezeichnet. Der 95 %-Vertrauensbereich aller Beobachtungen ergibt sich durch zwei Parallelen um die Regressionsgerade im Abstand $2 s_{y.x}$. Der Wert $s_{y.x}$ ist ein Maß für die Fehler, die bei der Schätzung oder Voraussage von y aus vorgegebenen Werten gemacht werden, daher wird diese Standardabweichung auch als "Standardfehler der Schätzung oder Voraussage" bezeichnet.

1 mg P/100 ml $\hat{=}$ 0,3229 mMol P/l Serum

6. Versuchsbeschreibungen

6.1 Versuch I

In diesem ersten Versuch ging es hauptsächlich darum, den besten Zeitpunkt für die P-Bestimmung zu finden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Olivenöl (DAB 7) als Lösungsmittel für Vitamin D₃ geeignet ist, und ob die einmalige Gabe von Vitamin D₃ (0,25-1 I.E.) über die Schlundsonde (0,2 ml/Tier) ausreicht, um die Wirkungen dieser geringen Dosen anzuzeigen.

6.1.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Die Sprague-Dawley-Ratten wurden nach einer 3wöchigen Depletionsperiode, in der sie in der 1. und 2. Woche das Futter (2 a) und in der 3. Woche das Futter (2 b) erhalten hatten, um 16 Uhr in den Versuchsstand umgesetzt und bekamen dann das Testfutter (2). Am darauffolgenden Tag wurde ihnen um 9 Uhr über die Schlundsonde als einmalige Gabe verabreicht:

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	6	0	0,2 ml Olivenöl
1	6	0,25	0,2 ml Olivenöl
2	6	0,5	0,2 ml Olivenöl
3	6	1	0,2 ml Olivenöl

Die Blutentnahme und anschließende P-Bestimmung wurde an den nächsten drei Tagen jeweils im 24-Stunden-Rhythmus um 9 Uhr früh durchgeführt.

6.1.2 Ergebnisse

Die erste Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen. Die erhaltenen Werte wurden auf Logarithmenpapier aufgetragen. Die dekadisch unterteilte Abszisse gibt den 1., 2., und 3. Tag der Blutentnahme, die logarithmisch unterteilte die Vitamin D_3 -Dosierungen an und die Ordinate jeweils die mg P/100 ml Serum.

Die Mittelwerte des 1., 2. und 3. Tages zeigen für die drei verwendeten Konzentrationen ein deutliches Maximum der Werte am 2. Tag (Abbildung 1 a). Eine Erklärung dafür ist, daß das Vitamin D_3 zuerst zu dem stark wirksamen Metaboliten $1,25-(OH)_2D_3$ umgewandelt werden muß, bevor es seine Wirksamkeit auf die Absorption aus dem Darm entfalten und so zu einer Erhöhung der Serumphosphatwerte führen kann. Am 3.Tag sank der Blutphosphatspiegel wieder, da das einmalig gegebene Vitamin D_3 zum Teil schon verbraucht war.

Ein Vergleich der Mittelwerte der drei Vitamin D_3 -Dosierungen zeigt, daß am 2. Tag eine Linearität besteht im Gegensatz zum 1. und 3. Tag.

Damit bietet der 2. Tag die beste Möglichkeit, die Wirksamkeit dieser drei Dosen (0,25-1 I.E.) zu verdeutlichen.

Oliveneröl ist als Lösungsmittel für Vitamin D_3 -Gaben geeignet. Die einmalige Gabe von Vitamin D_3 (0,25- 1 I.E.) über die Schlundsonde verabreicht, und zwar gelöst in 0,2 ml Olivenöl pro Tier, ermöglicht die Unterscheidung dieser geringen Dosen.

Abbildung 1a

VERSUCH I

- ▲ 0,25 I.E. Vit.D₃
- 0,5 I.E. Vit.D₃
- 1,0 I.E. Vit.D₃

mg P/100 ml
Serum

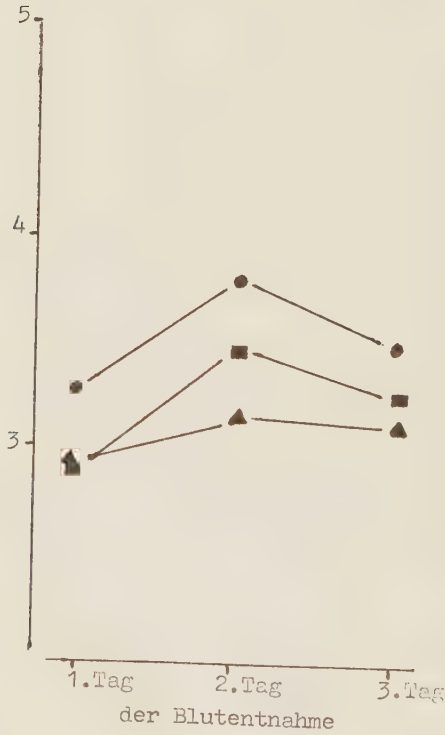
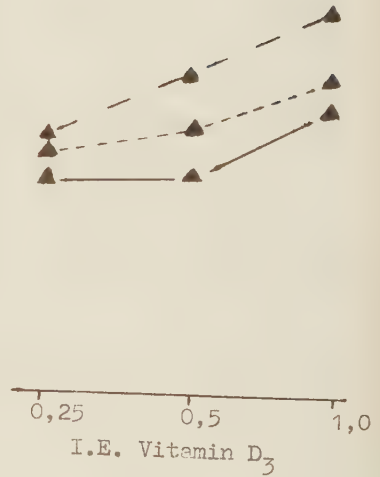


Abbildung 1b

VERSUCH I

- 1.Tag der Blutentnahme
- 2.Tag der Blutentnahme
- 3.Tag der Blutentnahme



6.2 Versuch II

Im Versuch II sollte untersucht werden, ob dies auch für größere Vitamin D₃-Dosierungen gilt. Bei dieser Gelegenheit wurde ein anderer Träger für Vitamin D₃, nämlich 96 %-Alkohol (DAB 7) in der gleichen Menge (0,2 ml/Tier) verwendet.

6.2.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
1	8	1	0,2ml abs. Alkohol
2	8	5	0,2ml abs. Alkohol
3	8	10	0,2ml abs. Alkohol
4	8	30	0,2ml abs. Alkohol

Die Blutentnahme fand wieder am 1. - 3. Tag nach der Vitamin D₃- Gabe im 24-Stunden-Rhythmus statt.

6.2.2 Ergebnisse

Ein Vergleich der Serumphosphatwerte des 1. - 3. Tages ergab auch bei Dosierungen von 1-30 I.E. Vitamin D₃ ein deutliches Maximum am 2. Tag nach der Vitamin D₃- Applikation (Abbildung 2 a).

Aus der Abbildung 2b geht hervor, daß in diesem Versuch am 1. und 2. Tag eine Linearität besteht. Die Steigung der Geraden des 2. Tages ist allerdings um etliches größer als die des 1. Tages, das heißt, daß am 2. Tag, wie im Versuch I schon angedeutet, die unterschiedlichen Dosen am besten zu beurteilen sind.

Der 2. Tag nach der Vitamin D₃-Gabe erweist sich also auch bei Dosierungen von 1-30 I.E. als der beste Zeitpunkt für die P-Bestimmung. Darüber hinaus zeigt sich, daß 96%-Alkohol als Träger für die Vitamin D₃-Gaben ebenfalls geeignet ist.

Abbildung 2a

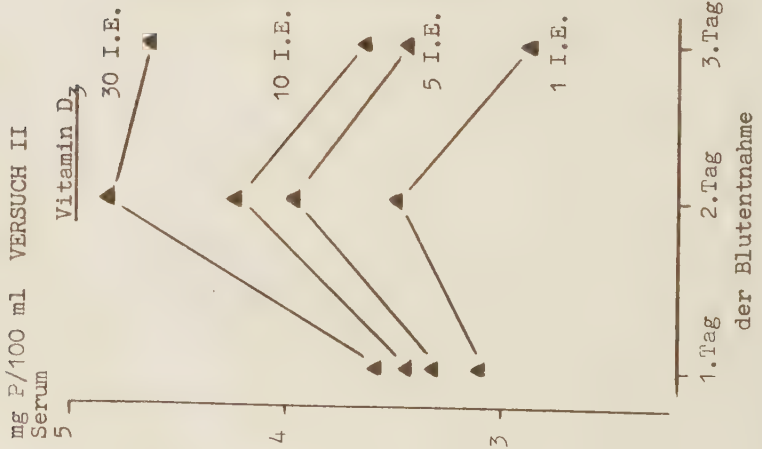
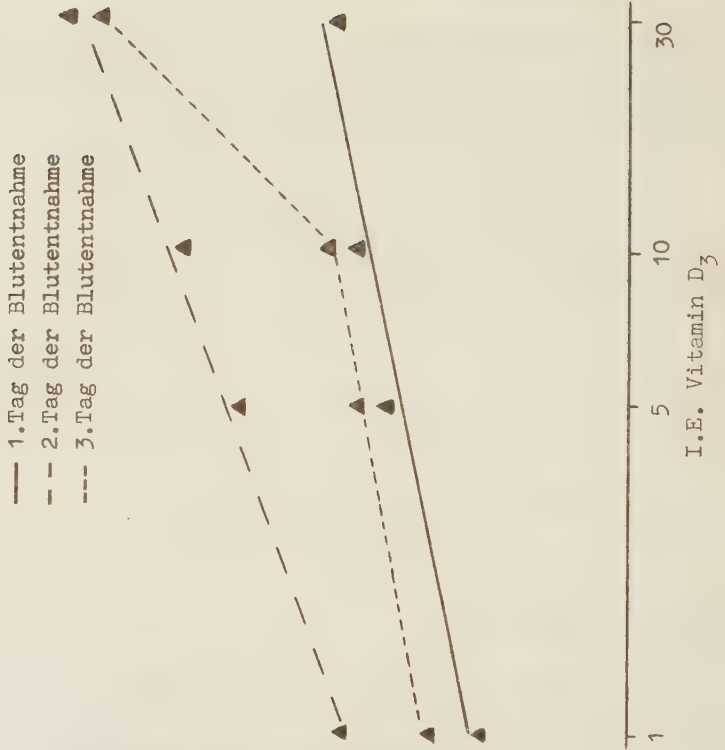


Abbildung 2b

VERSUCH II



6.3 Versuch III

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob sich die aus den Versuchen I und II gewonnenen Erkenntnisse auch auf 1,25-(OH)₂D₃ und Goldhafer übertragen lassen.

6.3.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E.Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	6	0	0,2 ml abs. Alkohol
1	6	1	0,2 ml abs. Alkohol
2	6	5	0,2 ml abs. Alkohol
3	6	10	0,2 ml abs. Alkohol
4	6	1,25-(OH) ₂ D ₃ ≈5	0,2 ml abs. Alkohol
5	6	1,25-(OH) ₂ D ₃ ≈10	0,2 ml abs. Alkohol
6	6	Goldhafer ≈5	0,2 ml abs. Alkohol
7	6	Goldhafer ≈10	0,2 ml abs. Alkohol

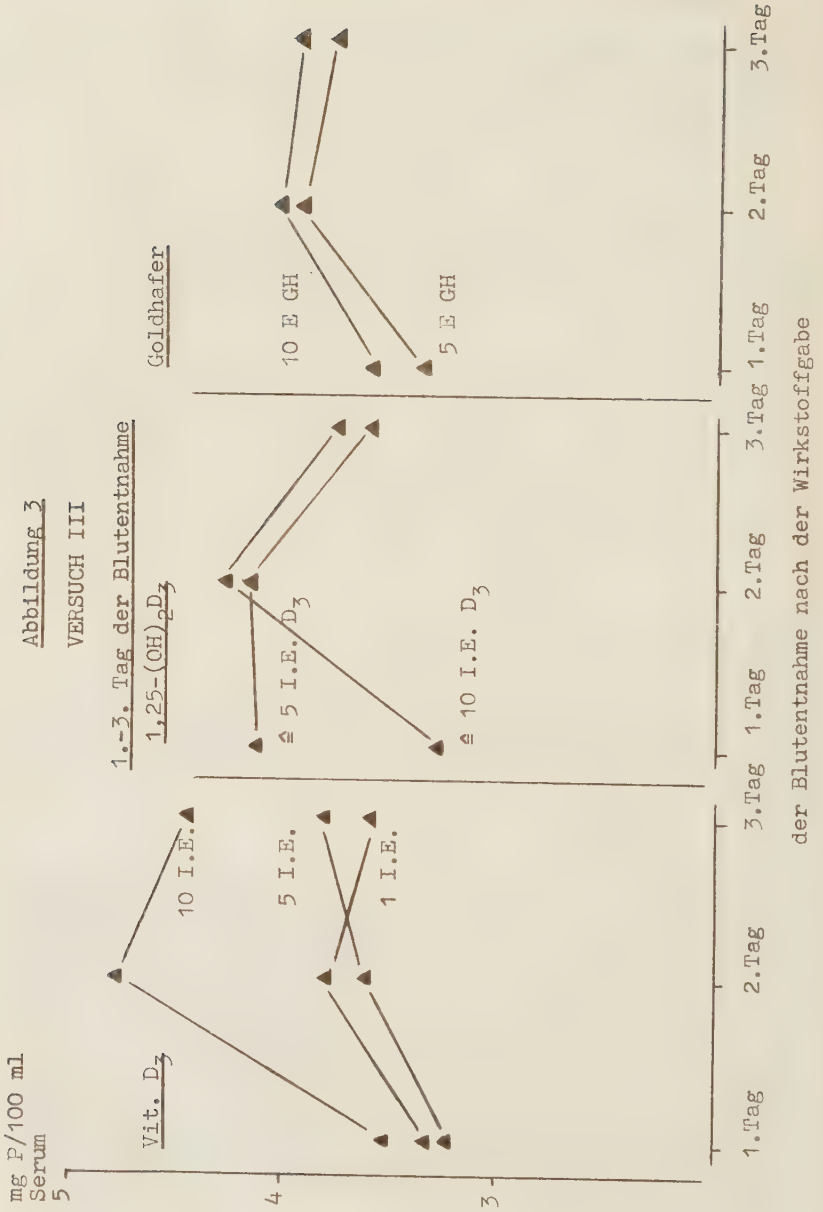
Die Blutentnahme erfolgte wieder am 1.-3. Tag nach der Wirkstoffgabe.

Bei der Herstellung des Goldhaferextraktes lag die Annahme zugrunde, daß in 1g TS 3 E ≈I.E. Vitamin D₃ enthalten sind.

6.3.2 Ergebnisse

Die Abbildung 3 zeigt auch für 1,25-(OH)₂D₃ und Goldhafer ein Maximum der Serumphosphatwerte am 2. Tag. Als einzige fiel die Gruppe, die 5 I.E. Vitamin D₃/Tier erhalten hatte, heraus. Bei ihr überlebten 2 Tiere die Narkose am 2. Tag nicht. Die Aussagefähigkeit des Mittelwertes der 4 übriggebliebenen Tiere ist daher sehr eingeschränkt.

Da Vitamin D₃, Goldhafer und 1,25-(OH)₂D₃ am gleichen Tag die höchsten Serumphosphatwerte hatten, kann deren Wirksamkeit untereinander verglichen werden.



6.4 Versuch IV

Neben einem Vergleich zwischen Olivenöl und 96%-Alkohol sollte dieser Versuch Aufschluß darüber geben, ob Olivenöl und 96%-Alkohol die Höhe der Serumphosphatwerte beeinflussen.

6.4.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E.Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	6	0	0
0	6	0	0,2 ml Olivenöl
1	6	1	0,2 ml Olivenöl
2	6	3	0,2 ml Olivenöl
3	6	5	0,2 ml Olivenöl
0	6	0	0,2 ml abs. Alkohol
4	6	1	0,2 ml abs. Alkohol
5	6	3	0,2 ml abs. Alkohol
6	6	5	0,2 ml abs. Alkohol

Die Ratten hatten eine 6stündige Hungerperiode vor dem Umsetzen auf das Testfutter. Die Blutentnahme wurde am 2. Tag nach der Vitamin D₃-Gabe durchgeführt.

6.4.2 Ergebnisse

Um die beiden Trägersubstanzen besser vergleichen zu können, wurden die Regressionsgeraden bestimmt. Sie lauten für Olivenöl $y = 2,79 + 1,42x$ und für 96%-Alkohol $y = 3,08 + 1,48x$.

Die Abbildung 4 gibt sie mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardabweichungen wieder. Die beiden Geraden haben fast die gleiche Steigung und sind nahezu parallel, nur daß die mit 96%-Alkohol als Träger ein um 0,3mg P/100 ml Serum höheres Niveau zeigt. Bei einer durchschnittlichen

$s = \pm 0,54$ liegt dies durchaus im Rahmen einer normalen Schwankung, daher sind diese Trägersubstanzen als gleichwertig zu bezeichnen.

Die Gruppe 0 ohne Lösungsmittel hatte einen Mittelwert von 3,09 mg P/100 ml Serum, die mit Olivenöl einen von 2,85 und die mit 96%-Alkohol einen von 3,02. Daraus geht hervor, daß weder Olivenöl noch 96%-Alkohol die Serumphosphatwerte erhöhen, was ihren weiteren Einsatz nicht mehr erlaubt hätte, da von einer Trägersubstanz zu fordern ist, daß sie den Versuchsparameter nicht beeinflußt.

Abbildung 4

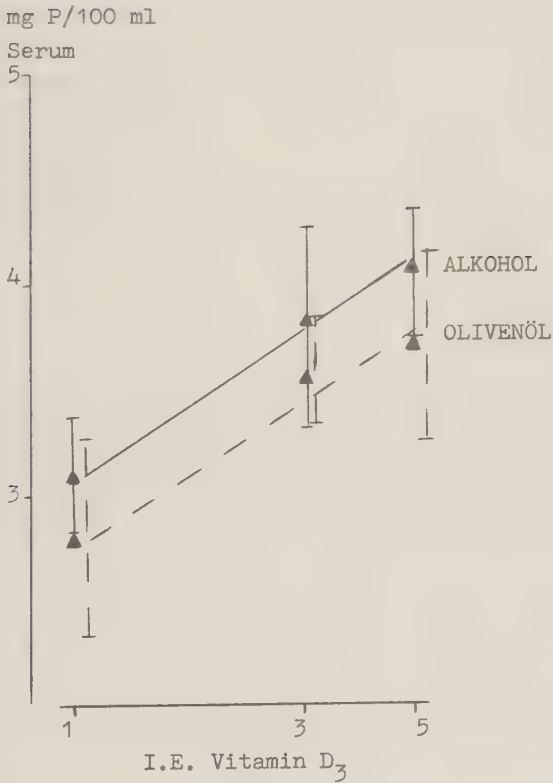
VERSUCH IV

VERGLEICH zwischen OLIVENÖL und ALKOHOL

Alkohol: $y = 3,08 + 1,48x$

Oliven-: $y = 2,79 + 1,42x$

öl



6.5 Versuch V

Dieser und die nachfolgenden Versuche wurden durchgeführt, um den Bereich zu ermitteln, in dem dieser Test eine quantitative Aussage zuläßt.

6.5.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	5	0	0,2 ml Olivenöl
1	6	1	0,2 ml Olivenöl
2	6	2	0,2 ml Olivenöl
3	6	3	0,2 ml Olivenöl
4	6	5	0,2 ml Olivenöl
5	6	7	0,2 ml Olivenöl
6	6	10	0,2 ml Olivenöl

6.5.2 Ergebnisse

Die Prüfung auf Linearität ergab, daß die Regressionsgerade $y = 3,46 + 0,85x$, die für die Korrelation zwischen den Vitamin D₃-Dosierungen (x-Werte) und den Serumphosphatwerten (y-Werte; mg P/100 ml Serum) errechnet wurde, die Linearität erfüllt, da $\hat{F} = 0,67 < 2,92 = F(4;30;0,05)$ ist. Die Linearitätshypothese kann nur solange aufrechterhalten werden, solange $F(\nu_1; \nu_2; 0,05)$ den aus einer Tabelle zu ersehenden Wert auf dem 5%-Signifikanzniveau nicht erreicht oder überschreitet ($\nu_1 = k-2, \nu_2 = n-k$ Freiheitsgrade; k = Anzahl der Gruppen, n = Gesamtzahl der Beobachtungen). Das 95%-Vertrauensband für alle Einzelwerte um die Regressionsgerade wurde aus $s_{y.x} = \pm 0,54$ festgestellt. Es

liefert zwei Parallelen zur Regressionsgeraden im Abstand von 0,54 (mg P/100ml Serum), die einen Bereich abgrenzen, der 95 % aller Werte umfaßt. Die Vertrauensgrenzen ($P < 0,05$) für den Regressionskoeffizienten betragen $b_{y \ x} \pm 0,55$, für den Achsenabschnitt $a_{y \ x} \pm 0,35$. Die Restvarianz $d_{yx}^2 = 0,29$ weist als untere Grenze 0,19 und als obere 0,5 auf. Abbildung 5 gibt die Regressionsgerade mit den errechneten Mittelwerten, den Standardabweichungen, dem 95 %- Vertrauensband für die Regressionsgerade (Tabelle 5) und für alle Einzelwerte wieder.

Der signifikante ($P < 0,05$) Rangkorrelationskoeffizient $\hat{r} = 2,72 > 1,96$ zeigt an, daß zwischen dem Untersuchungsparameter "Serumphosphat" und verschiedenen Vitamin D₃-Dosierungen eine hinreichend enge Beziehung besteht. Die Abbildung 5 läßt erkennen, daß die Mittelwerte der einzelnen Gruppen nahe der Regressionsgeraden liegen. Sie gibt also ziemlich gut die erhaltenen Werte wieder, wenn auch ihr 95 %-Vertrauensband etwas weit ist. Sämtliche Mittelwerte befinden sich innerhalb des durch die zwei Parallelen um die Regressionsgerade angegebenen 95 %-Vertrauensbereiches aller Werte.

Insgesamt läßt sich sagen, daß die statistische Auswertung dieses Versuches eine mögliche Aussage des Testes in einem Bereich von 1-10 I.E. Vitamin D₃, einmalig pro Tier gegeben, anzeigt.

Tabelle 5

Versuch V

Serumwerte (mg P/100 ml Serum)

	Gr. 0	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 5	Gr. 6
Ø	3,36	3,50	3,73	3,93	3,74	4,29	4,39
$\pm s$	0,51	0,57	0,38	0,40	0,26	0,70	0,80
n	5	6	6	6	6	6	6

Punkte für das 95 %-Vertrauensband der Regressionsgeraden
für $x = 1, 2, 3, 5, 7$ u. 10 I.E. Vitamin D_3

$\hat{Y} - B_x$	$\hat{Y} + B_x$
3,03	3,89
3,39	4,05
3,61	4,13
3,77	4,33
3,83	4,53
3,88	4,74

Abbildung 5

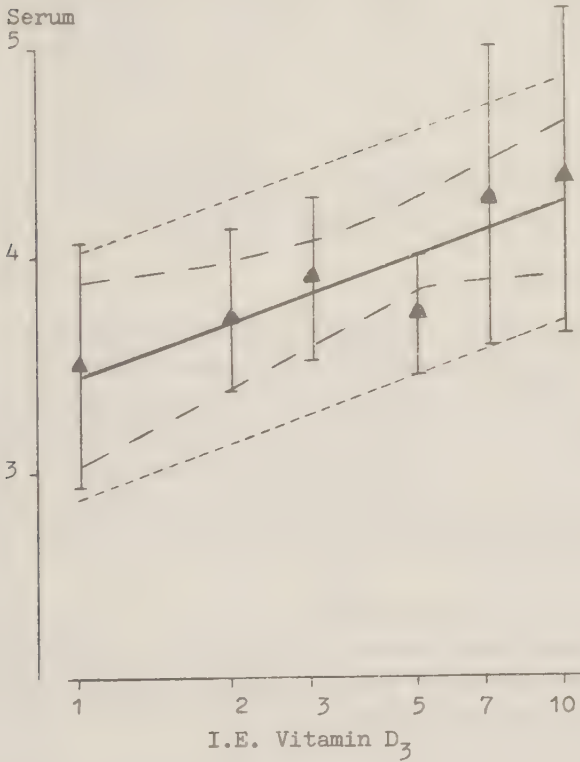
VERSUCH V

— Regressionsgerade

-- 95%-Vertrauensband der Regressions-
geraden

--- 95%-Vertrauensbereich für alle
Einzelwerte

mg P/100 ml Serum $y = 3,46 + 0,85x$



6.6 Versuch VI

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob auch Dosierungen bis zu 30. I.E. Vitamin D₃ statistisch verwertbare Ergebnisse liefern.

6.6.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	4	0	0,2 ml Olivenöl
1	6	0,5	0,2 ml Olivenöl
2	6	2	0,2 ml Olivenöl
3	6	5	0,2 ml Olivenöl
4	6	10	0,2 ml Olivenöl
5	6	15	0,2 ml Olivenöl
6	6	20	0,2 ml Olivenöl
7	6	30	0,2 ml Olivenöl

6.6.2 Ergebnisse

Die Regressionsgerade errechnete sich für diesen Versuch zu $y = 4,15 + 0,56x$; $t = 3,78 > 1,96$, ist signifikant.

Die Prüfung auf Linearität ergab, daß die Regressionsgerade mit $F = 1,18 < 2,49 = F(5;35;0,05)$ die Anforderungen erfüllt.

Der Standardfehler der Schätzung $s_{y \cdot x}$ beträgt $\pm 0,54$. Die Vertrauensgrenzen sind für $b_{yx} \pm 0,28$, ebenso für a_{yx} und der Vertrauensbereich für $d_{yx}^2 = 0,29$ liegt zwischen 0,195 und 0,475.

Neben dem hohen Serumphosphatwert der Gruppe 0 von 4,05 mgP/100ml fällt die flache Steigung b (Abbildung 6) auf. Dieser hohe Nullwert verringert die Unterschiede zwischen den einzelnen Vitamin D₃-Dosierungen (Tabelle 6) und verschlechtert somit die Differenzierungsmöglichkeiten.

Trotzdem gibt die Regressionsgerade in diesem Versuch die erhaltenen Mittelwerte noch gut wieder; die übrigen Ergebnisse bestätigen dies. Damit läßt sich der Dosisbereich dieses Testes wahrscheinlich bis auf 30 I.E. Vitamin D₃ erweitern.

Tabelle 6

Versuch VI

Serumwerte (mg P/100 ml Serum)

	Gr. 0	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 5	Gr. 6	Gr. 7
$\bar{y}$	4,05	4,18	4,28	4,18	4,64	4,67	5,06	5,17
$\pm s$	0,60	0,70	0,50	0,40	0,60	0,50	0,70	0,20
n	4	6	6	6	6	6	6	6

Punkte für das 95 %-Vertrauensband der Regressionsgeraden

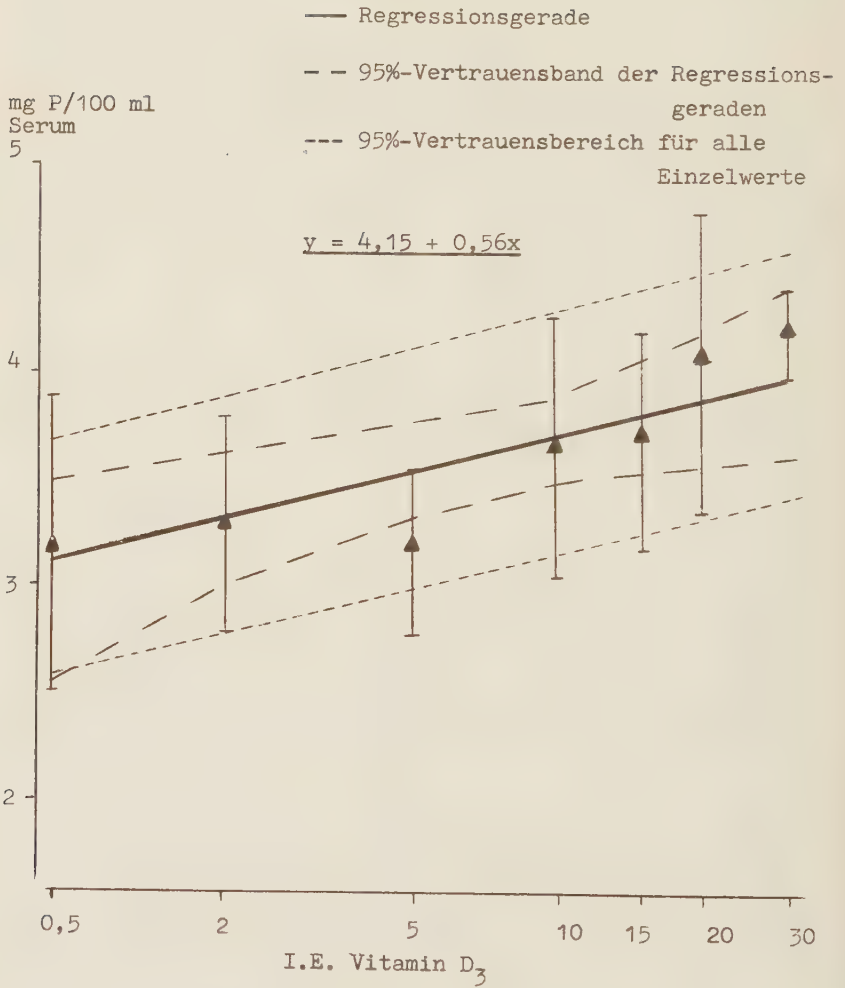
x = 0,5, 2, 5, 10, 15, 20 und 30 I.E.

Vitamin D₃

$\hat{y} - B_x$	$\hat{y} + B_x$
3,48	4,48
4,00	4,64
4,30	4,78
4,46	4,86
4,53	5,09
4,57	5,19
4,62	5,34

Abbildung 6

VERSUCH VI



6.7 Versuch VII

Eine Plateaubildung zeigte sich bei 30 I.E. Vitamin D₃ noch nicht, daher wurden in diesem Versuch noch höhere Dosierungen verwendet.

6.7.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	6	0	0,2 ml Olivenöl
1	6	3	0,2 ml Olivenöl
2	6	5	0,2 ml Olivenöl
3	6	10	0,2 ml Olivenöl
4	6	20	0,2 ml Olivenöl
5	6	30	0,2 ml Olivenöl
6	6	50	0,2 ml Olivenöl
7	6	80	0,2 ml Olivenöl

6.7.2 Ergebnisse

Die Regressionsgerade lautet: $Y = 3,28 + 0,9x$; $z = 3,59 > 1,96$, ist signifikant. Die Regressionsgerade bestand die Prüfung auf Linearität, da $F = 1,66 < 2,49 = F(5;35;0,05)$ ist.

Die anderen Werte betragen für $s_{y.x} = \pm 0,69$, $b_{yx} = 0,9 \pm 0,44$, $a_{yx} = 3,28 \pm 0,58$ und für $r^2_{yx} = 0,48$.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergibt eine nur sehr geringe Aussagefähigkeit der Regressionsgerade, die nicht für eine quantitative Beurteilung verwertbar ist.

Der Versuch VI deutete darauf hin, daß auch über 30 I.E. hinaus ein Anstieg der Serumphosphatwerte möglich wäre. Diese Annahme konnte der Versuch VII nicht bestätigen, im Gegenteil, die 30 I.E. stellten das Maximum dar. Danach fallen die Werte etwas ab, um dann zwischen 50 und 80 I.E. nahezu auf dem gleichen Niveau zu bleiben (Abbildung und Tabelle 7). Anders verhält es sich dagegen, wenn angenommen

wird, daß der Wert für 30 I.E. zu hoch ist, da er auch am weitesten von der Regressionsgerade entfernt liegt. Unter dessen Außerachtlassung ließe sich eine Plateaubildung ab einen Bereich von ungefähr 30 I.E. Vitamin D₃ erkennen.

Die beiden letzten Versuche deuten darauf hin, daß dieser Test eine Aussage in einem Bereich von 0,5-30 I.E. Vitamin D₃ zuläßt. Ab 30 I.E. scheint eine Plateaubildung zu beginnen, die eine Differenzierung höherer Vitamin D₃-Dosierungen nicht mehr ermöglicht.

Tabelle 7

Versuch VII

Serumwerte (mg P/100 ml Serum)

	Gr.0	Gr.1	Gr.2	Gr. 3	Gr. 4	Gr.5	Gr.6	Gr.7
Ø	3,35	3,59	3,95	3,89	4,70	5,15	4,59	4,67
± s	1,00	0,92	0,55	0,55	0,70	0,64	0,76	0,47
n	6	6	6	6	6	6	6	6

Punkte für das 95 %-Vertrauensband der
Regressionsgeraden mit

x = 3, 5, 10, 20, 30, 50 und 80 I.E. Vitamin D₃

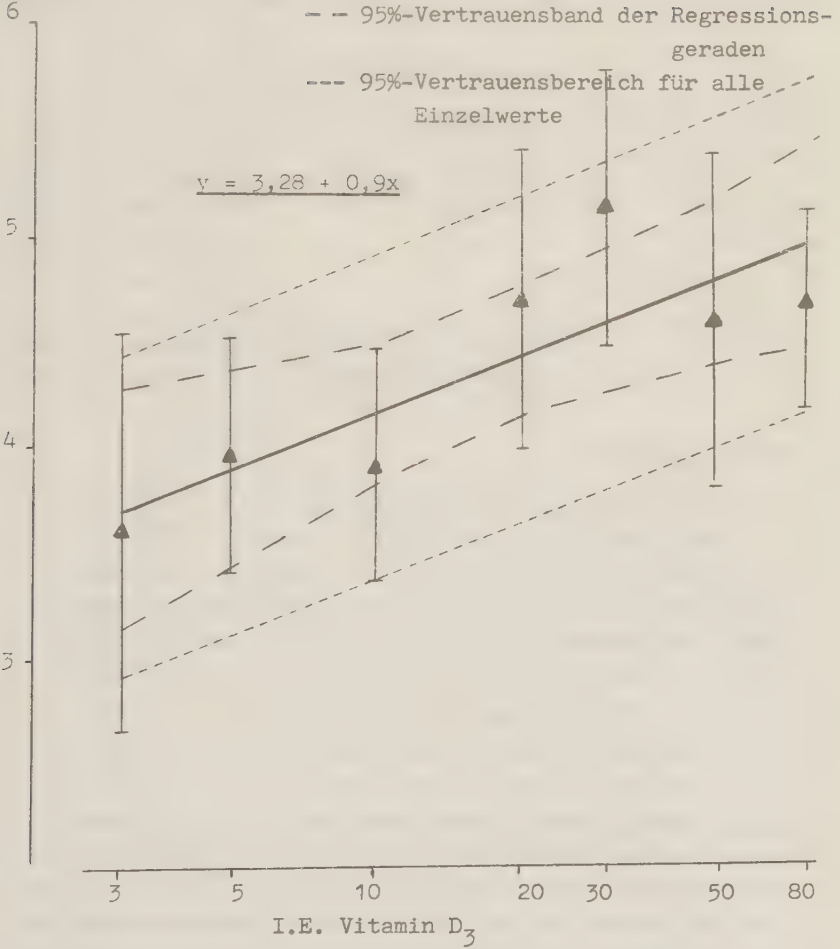
<u>$\hat{Y} - B_x$</u>	<u>$\hat{Y} + B_x$</u>
3,16	4,26
3,46	4,36
3,85	4,51
4,14	4,76
4,27	4,95
4,38	5,24
4,47	5,51

Abbildung 7

VERSUCH VII

mg P/100 ml

Serum



6.8 Versuch VIII

In den nächsten Versuchen sollte statt Olivenöl 96 %-Alkohol als Träger für die Vitamin D₃-Gaben verwendet werden, der nach den Ergebnissen des Versuchs IV mit Olivenöl gleichwertig ist.

6.8.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	7	0	0,2 ml abs. Alkohol
1	8	0,5	0,2 ml abs. Alkohol
2	8	1	0,2 ml abs. Alkohol
3	8	2	0,2 ml abs. Alkohol
4	8	3	0,2 ml abs. Alkohol
5	8	5	0,2 ml abs. Alkohol
6	8	10	0,2 ml abs. Alkohol

6.8.2 Ergebnisse

Die Regressionsgerade errechnete sich zu $\hat{y} = 2,85 + 1,08x$. Der Rangkorrelationskoeffizient ist mit $\hat{z} = 3,63 > 1,96$ signifikant. $\hat{F} = 1,13 < 2,61 = F(4;42;0,05)$ bestätigt die Linearität der Regressionsgeraden. Der Standardfehler der Schätzung beträgt $s_{y.x} = \pm 0,21$. Die Vertrauensgrenzen sind für $b_{yx} = 1,08 \pm 0,14$ und für $a_{yx} = 2,85 \pm 0,08$; der Vertrauensbereich liegt für $s^2_{yx} = 0,044$ zwischen 0,03 und 0,07.

In der Abbildung 8 fällt die Gruppe 4 (3 I.E.) auf, die außerhalb des 95%-Vertrauensbereiches aller Einzelwerte liegt. Die Streuung dieser Gruppe weist mit $s = \pm 0,8$ (Tabelle 8) einen überdurchschnittlich hohen Wert auf. Abgesehen von diesem Mittelwert liegen die übrigen nahe der Regressionsgeraden und untermauern mit der statistischen Auswertung auch für 96%-Alkohol, daß in einem Bereich von 0,5-10 I.E. Vitamin D₃ eine reproduzierbare Beziehung zwischen der Höhe der Serumphosphatwerte und den Vitamin D₃-Dosierungen besteht.

Tabelle 8

Versuch VIII

Serumwerte (mg P/100 ml Serum)

	Gr.0	Gr.1	Gr.2	Gr.3	Gr.4	Gr.5	Gr.6
$\bar{y}$	2,64	2,53	3,02	3,22	2,94	3,70	4,06
$\pm s$	0,40	0,50	0,65	0,36	0,80	0,54	0,40
n	7	8	8	8	8	8	8

Punkte für das 95 %-Vertrauens-
band der Regressionsgeraden mit
x = 0,5 , 1, 2, 3, 5, und 10 I.E.
Vitamin D₃

$\hat{y} - B_x$

2,36

2,70

3,09

3,28

3,49

3,78

$\hat{y} + B_x$

2,68

3,00

3,27

3,46

3,71

4,08

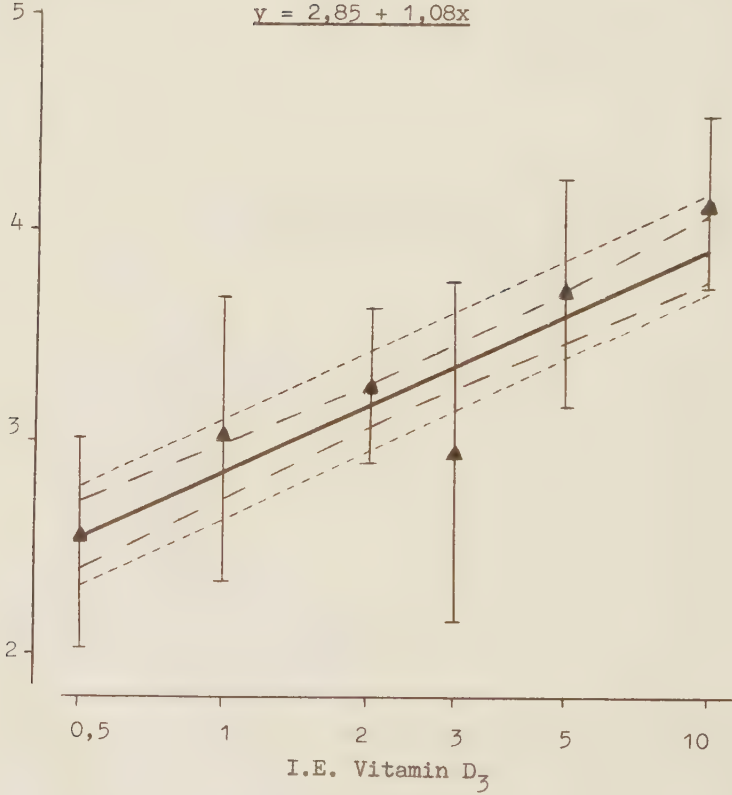
Abbildung 8

VERSUCH VIII

- Regressionsgerade
- - 95%-Vertrauensband der Regressionsgeraden
- 95%-Vertrauensbereich für alle Einzelwerte

mg P/100 ml
Serum

$$y = 2,85 + 1,08x$$



6.9 Versuch IX

Dieser Versuch sollte klären, ob auch für 96%-Alkohol die Dosis-Wirkungs-Kurve bis zu 30 I.E. Vitamin D₃ linear ist. Dazu wurde der Versuch II, der neben den Versuchen I und III den 2. Tag nach der Vitamin D₃-Gabe als den besten Zeitpunkt für die Blutentnahme angezeigt hatte, statistisch ausgewertet.

6.9.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
1	8	1	0,2 ml abs. Alkohol
2	8	5	0,2 ml abs. Alkohol
3	8	10	0,2 ml abs. Alkohol
4	8	30	0,2 ml abs. Alkohol

6.9.2 Ergebnisse

Die Regressionsgerade lautet $y = 3,45 + 0,83x$;
 $\hat{z} = 4,26 > 1,96$, ist signifikant. Die Linearität wurde mit
 $F = 0,4 < 3,34 = F(2;28;0,05)$ bestätigt. Die Streuung um die
 Regressionsgerade ergab sich zu $s_{y.x} = \pm 0,38$. Die Vertrauens-
 bereiche liegen für $b_{yx} = 0,83$ zwischen 0,56 u. 1,1, für
 $a_{yx} = 3,45$ zwischen 3,21 u. 3,69 und für $\sigma^2_{yx} = 0,14$ zwischen
 0,09 u. 0,25.

Aus der Abbildung 9 geht hervor, daß die Mittelwerte mit ihren niedrigen Standardabweichungen nahe bei der Regressionsgeraden liegen. Sie gibt also die erhaltenen Ergebnisse ziemlich genau wieder (Tabelle 9); dies bestätigt auch die übrige statistische Auswertung.

Insgesamt läßt sich sagen, daß nach den letzten beiden Versuchen auch für 96%-Alkohol als Trägersubstanz ein Meßbereich von 0,5-30 I.E. Vitamin D₃ besteht, wie er sich schon für Olivenöl abzeichnete.

Tabelle 9

Versuch IX

Serumwerte (mg P/100 ml Serum)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
$\bar{x}$	3,51	3,96	4,23	4,76
$\pm s$	0,51	0,23	0,48	0,23
n	8	8	8	8

Punkte für den 95 %-Vertrauensbereich
der Regressionsgeraden mit $x = 1,5, 10$
und 30 I.E. Vitamin D₃

$\hat{y} - B_x$

3,11

3,84

4,08

4,37

$\hat{y} + B_x$

3,79

4,22

4,45

4,99

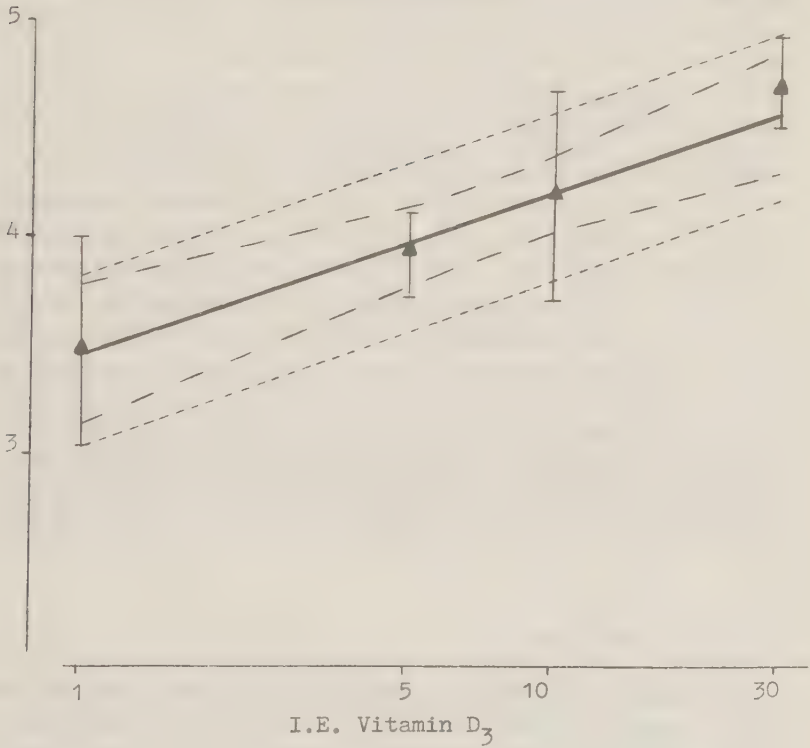
Abbildung 9

VERSUCH IX

- Regressionsgerade
- - 95%-Vertrauensband der Regressionsgeraden
- 95%-Vertrauensbereich für alle Einzelwerte

mg P/100 ml
Serum

$y = 3,45 + 0,83x$



6.10 Versuch X

Aufgrund der Ergebnisse der Versuche I - III wurde die Blutentnahme und anschließende P-Bestimmung stets 48 Stunden nach der Vitamin D₃-Gabe durchgeführt. Die zurückliegenden Versuche und besonders die, die statistisch ausgewertet wurden, wiesen diesen Zeitpunkt als geeignet aus.

Der folgende Versuch sollte den Serumphosphatspiegel in seiner zeitlichen Abhängigkeit genauer einengen, daher wurde die Wirkung von 1,25-(OH)₂D₃, Goldhafer und auch Vitamin D₃ 36, 48 und 60 Stunden nach ihrer Applikation über die Schlundsonde gemessen.

6.10.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0	8	0	0,2 ml abs. Alkohol
1	8	5	0,2 ml abs. Alkohol
2	8	10	0,2 ml abs. Alkohol
3	8	1,25-(OH) ₂ D ₃ $\hat{=}$ 10	0,2 ml abs. Alkohol
4	8	Goldhafer $\hat{=}$ 5	0,2 ml abs. Alkohol
5	8	Goldhafer $\hat{=}$ 10	0,2 ml abs. Alkohol

Die Blutentnahme wurde 36, 48 und 60 Stunden nach der Wirkstoffgabe vorgenommen. Dabei fielen der 36- und 60-Stunden-Zeitpunkt auf den Abend (18 Uhr), der 48-Stunden-Zeitpunkt dagegen auf den Morgen (6 Uhr).

6.10.2 Ergebnisse

Die graphische Darstellung (Abbildung 10), bei der die dekadisch unterteilte Abszisse den Zeitpunkt der Blutentnahme und die Ordinate die mg P/100 ml Serum angeben, zeigt folgendes Ergebnis:

Sämtliche Wirkstoffgruppen und auch die Gruppe 0 hatten nach 36 und 60 Stunden höhere Serumphosphatwerte als nach 48 Stunden. Wie schon erwähnt, fand die Blutentnahme nach 36 und 60 Stunden abends (18 Uhr), die nach 48 Stunden morgens (6 Uhr) statt. Die höheren Serumphosphatwerte wurden also immer zur selben Zeit festgestellt, und zwar abends.

Wie läßt sich dieses Ergebnis erklären, wenn davon ausgegangen werden muß, daß ein Wirkstoff nach einem Abfall nicht einen zweiten Gipfel zeigen kann, da er durch die Metabolisierung ständig an Wirksamkeit verliert. Ein Maß für die Verweildauer eines Stoffes und damit auch indirekt für dessen Wirkdauer stellt die biologische Halbwertszeit dar. Sie schließt eine Erklärung dieser Erscheinung über die Wirkstoffgabe aus; das gleichartige Verhalten der Gruppe 0, die nur das Testfutter erhalten hatte, untermauert dies.

Unter Umständen deuten die höheren Serumphosphatwerte bei der abendlichen Blutentnahme auf einen geringeren Futterverzehr tagsüber und der niedrigere Wert auf einen gesteigerten Verzehr in der Abendzeit hin. Dies würde genau den Verzehrsgewohnheiten der nachtaktiven Ratte entsprechen. Somit ließen sich, falls diese Annahme stimmt, die vor kommenden Schwankungen allein über den Futterverzehr und damit über das Testfutter erklären.

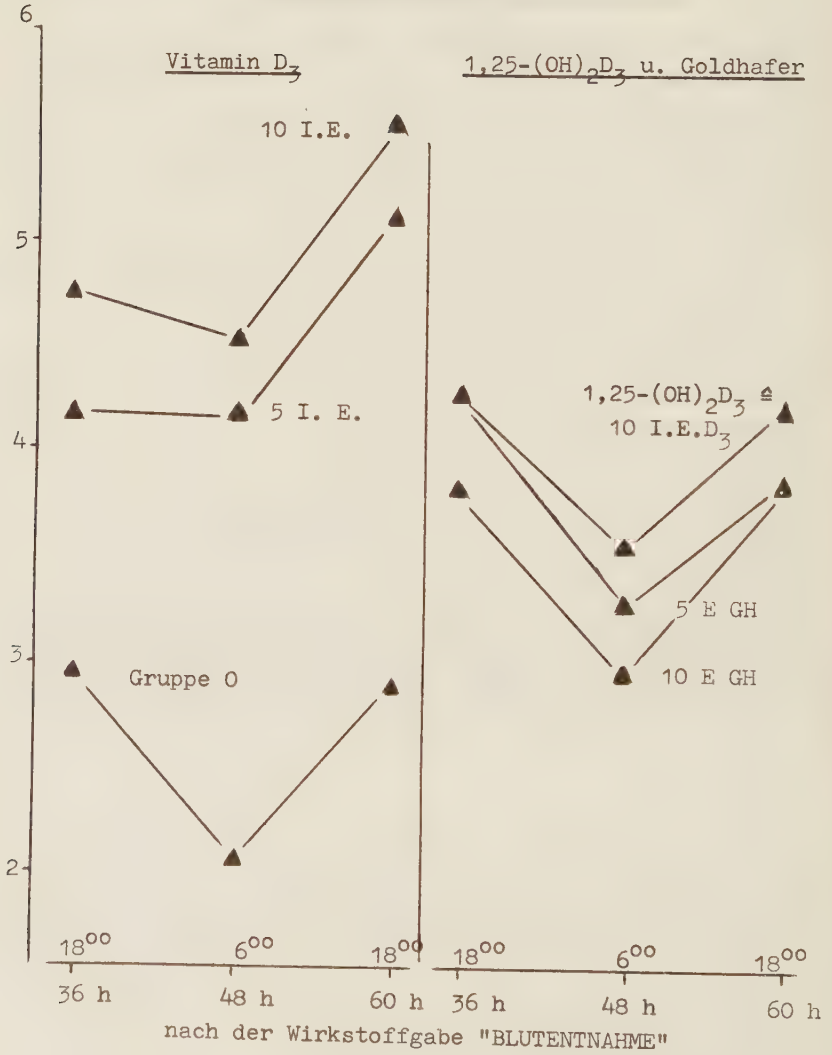
Eine Wiederholung dieses Ergebnisses in weiteren Untersuchungen würde bestätigen, daß die Beachtung der Tageszeit auch für dieses Kriterium (Serumphosphat) außerordentlich wichtig ist.

Abbildung 10

VERSUCH X

mg P/100 ml
Serum

Tageszeitliche Abhängigkeit der
Serumphosphatwerte



6.11 Versuch XI

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die tageszeitlichen Schwankungen der Serumphosphatwerte vom Verzehrsrhythmus der Ratten abhängen. Um dies klären zu können, wurde eine zweite Gruppe 0 eingesetzt, der abends das Testfutter entzogen wurde.

6.11.1 Tiermaterial und Versuchsdurchführung

Gruppe	n	I.E. Vitamin D ₃	Lösungsmittel
0/1	8	0	0,2 ml abs. Alkohol
0/2	8	0	0,2 ml abs. Alkohol
1	8	1	0,2 ml abs. Alkohol
2	8	5	0,2 ml abs. Alkohol
3	8	10	0,2 ml abs. Alkohol
4	8	1,25-(OH) ₂ D ₃ ^a 10	0,2 ml abs. Alkohol

Die Blutentnahme erfolgte wieder 36, 48 und 60 Stunden nach der Wirkstoffgabe, nur tageszeitlich genau umgekehrt, das heißt, der 36- und 60-Stunden-Zeitpunkt fiel auf den Morgen (6 Uhr), der 48-Stunden-Zeitpunkt dagegen auf den Abend (18 Uhr).

Die Tiere der Gruppe 0/2 erhielten 24 und 48 Stunden nach der Vitamin D₃-Gabe jeweils zwischen 18 und 6 Uhr, also 12 Stunden lang, kein Testfutter.

6.11.2 Ergebnisse

Die graphischen Darstellungen (Abbildung 11 und 12) und die Tabelle 10 verdeutlichen die Ergebnisse dieses Versuches.

Die Wirkstoffgruppen (Vitamin D₃ und 1,25-(OH)₂D₃) zeigten nach 36 und 60 Stunden (jeweils morgens) tiefe Serumphosphatwerte, dagegen nach 48 Stunden (abends) hohe. Die Höhe der Serumphosphatwerte folgte genau der Umkehrung der Blutentnahmezeitpunkte.

Die Gruppen 0/1 und 0/2 (12stündiges Fasten) sollten den Einfluß des Futterverzehr auf die Höhe der Serumphosphatwerte bestätigen oder widerlegen. Wenn die Annahme seines Einflusses auf die Serumphosphatwerte richtig wäre, müßte bei der Gruppe 0/2 der Wert morgens nach 12stündigem Fasten hoch und abends nach dem durch das Fasten vermehrten Futterverzehr niedrig sein. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Annahme, da die Gruppe 0/1 jeweils am Morgen, also nach 36 und 60 Stunden, extrem niedrige und abends hohe Serumphosphatwerte zeigte. Genau gegenteilig verhielt sich die Gruppe 0/2; sie hatte am Morgen extrem hohe, abends dagegen niedrige Serumphosphatwerte.

Mit den beiden letzten Versuchen wurde also gezeigt, daß eine diurnale Abhängigkeit der Serumphosphatwerte besteht, und daß sie durch den Futterverzehr beeinflusst wird. Ein hoher Verzehr bewirkt also niedrige Serumphosphatwerte und umgekehrt.

Tabelle 10

Versuch XI

	<u>Serumwerte (mg P/100 ml Serum)</u>		
	36 h	48 h	60 h
	morgens (6 Uhr)	abends (18 Uhr)	morgens (6 Uhr)
Gruppe 0/1	2,02	3,52	1,75
Gruppe 0/2*	4,57 !	3,25	4,63 !
Gruppe 1	2,66	4,55	2,48
Gruppe 2	3,43	5,07	3,19
Gruppe 3	3,84	5,15	4,03
Gruppe 4	3,41	4,93	2,98

* Gruppe 0/2, 12stündiges Fasten (18-6 Uhr)

Abbildung 11

VERSUCH XI

mg P/100 ml
Serum

Tageszeitliche Abhängigkeit der
Serumphosphatwerte

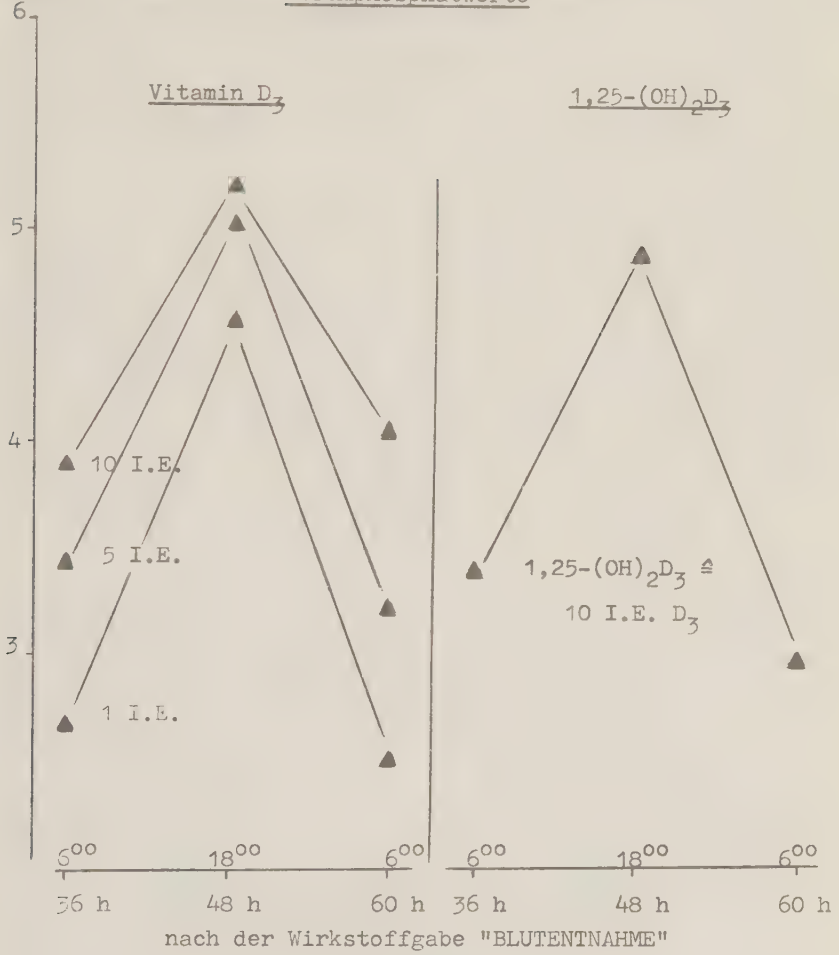


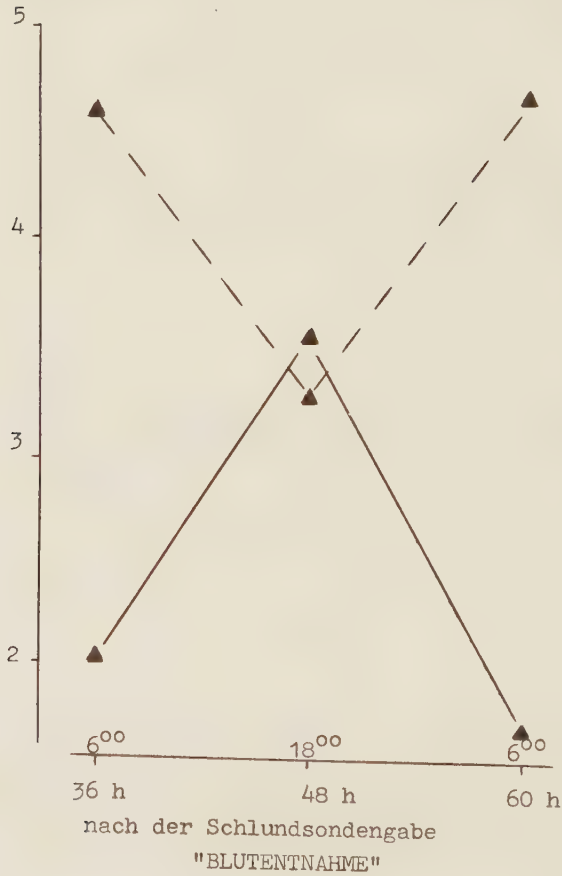
Abbildung 12

VERSUCH XI

— Gruppe 0

-- Gruppe 0 mit Futterabsetzen,
abends für 12 h

mg P/100 ml
Serum



6.12: Goldhaferversuche

Zwei Versuche wurden mit verschiedenen Vitamin D₃- und Goldhaferdosierungen durchgeführt. Dabei sollte versucht werden, über Vitamin D₃ als "Standard" die Wirksamkeit des Goldhafers einzustufen. Die verwendeten Vitamin D₃-Dosen lagen zwischen 0,5 und 5 I.E.. Bei der Herstellung der verschiedenen Goldhaferfraktionen wurde, wie schon im Versuch III erwähnt, von der Annahme ausgegangen, daß in 1 g TS 3 E $\approx$ I.E. Vitamin D₃ enthalten sind. Diese Annahme sollte für die drei Goldhaferdosen 1,3 und 5 E überprüft werden. Die Herstellung einer schlundsondengerechten Applikationsform mit 96 %-Alkohol als Träger bereitete einige Schwierigkeiten. Die beiden Versuche führten zu keinem verwertbaren Ergebnis und ließen keine Beurteilung der Wirkstoffaktivität des Goldhafers zu. Bei einem Versuch wiesen die Vitamin D₃-Dosen zu starke Schwankungen auf, so daß schon aus diesem Grunde keine Einstufung des Goldhafers hinsichtlich seiner Effekte möglich gewesen wäre. Die Goldhafergruppen hatten Serumphosphatwerte, die nicht den Dosierungen entsprachen, das heißt, die 1 E zeigte zum Beispiel einen höheren Wert als die Gruppe mit 3 E Goldhafer.

Als Fehlerquellen kommen hauptsächlich die Extraktionsverfahren in Betracht. Hier kann es mangels Erfahrung zu Verlusten gekommen sein. Besondere Schwierigkeiten bereitete es, den Goldhafer in eine für die Schlundsonde geeignete Form zu bringen. Unter Umständen verteilte sich der Goldhaferextrakt nicht gleichmäßig in der Trägersubstanz (96 %-Alkohol). Die verwendete Charge (Ernte '78) scheidet jedenfalls als Ursache weitestgehend aus, da ihre Aktivität in anderen Untersuchungen den Erwartungen entsprach. Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten wurde zugunsten anderer Versuche auf eine Weiterbearbeitung dieser Frage verzichtet.

7. Diskussion

7.1 Wirkungsweise der Vordiäten

Sinn der Depletion ist es, die Tiere auf eine möglichst gleiche Ausgangslage hinsichtlich ihres Vitamin D-Status zu bringen. Diese Maßnahme verlängert zwar die Gesamtdauer des Testes, erhöht aber dessen Genauigkeit. Um bei Ratten eine Rachitis zu erzielen, genügt nicht nur eine Vitamin D₃-freie Ernährung, sondern es muß auch eine Veränderung des Ca:P-Verhältnisses vorgenommen werden.

In den ersten zwei Wochen erhielten die mit 40 g angekauften Ratten das Futter 2a (Ca:P $\approx$ 0,4:0,5; Vitamin D₃-frei). Durch dieses Futter werden die Vitamin D-Speicher allmählich entleert. Der Organismus kann dann schließlich nur noch passiv durch Diffusion vom Darm aus Calcium resorbieren. Bedingt durch den niedrigen Ca-Gehalt der Diät ist dieser Transport aber minimal. Dadurch kommt es zum Absinken des Ca-Blutspiegels. Die weiteren Reaktionen auf dieses Futter werden durch das Parathormon und das Thyreokalzitinin als dessen Gegenspieler gesteuert.

Das Absinken des Ca- Blutspiegels aktiviert die Nebenschilddrüsen und führt so zu erhöhter Parathormonausschüttung. Dieses setzt über eine vermehrte Osteoklastenbildung aus den Knochen Calcium und damit auch Phosphat frei. Die Osteoblastenbildung dagegen wird durch das Parathormon gehemmt. Gleichzeitig verringert es die tubuläre Rückresorption von Phosphat in der Niere, so daß es zu einer Phosphaturie kommt. Dadurch wird ein unkontrollierter Anstieg des Blutphosphatspiegels verhindert.

Für die ersten beiden Wochen wurde ein Futter (2a) mit einem engen Ca:P-Verhältnis gewählt, um das Wachstum der Tiere nicht zu sehr zu behindern. Noch weniger Calcium, etwa wie im Futter (2b), würde die in dieser Wachstumsphase erforderliche Skelettentwicklung zu sehr hemmen.

In der dritten Woche erhielten die Tiere das Futter 2b ($\text{Ca:P} \approx 0,09: 0,3$; Vitamin D_3 -frei). Dieses Futter enthält nur noch Spuren von Calcium. Der Körper ist also darauf angewiesen, seinen Ca-Blutspiegel allein durch die Mobilisierung aus dem Skelett über das Parathormon aufrechtzuerhalten. Deswegen kommt es zu einem sogenannten "Booster-Effekt", das heißt, zu einer überschießenden Parathormonfreisetzung, die den Ca-Blutspiegel stabilisieren soll, aber dabei das Tier immer rachitischer macht. Gegen diese übermäßige Reaktion des Organismus arbeitet das durch einen zu hohen Ca-Blutspiegel aktivierte Thyreokalzitinin. Am Ende der einwöchigen Fütterung mit der 2. Vordiat (2b) weisen die Tiere dann einen P-Spiegel von 11 - 12 mgP/100 ml Serum auf. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß durch diesen Booster-Effekt solch große Mengen an Phosphat freigesetzt werden, daß die Ausscheidungskapazität der Niere überschritten wird. Dadurch wird die regulierende Wirkung des Parathormons auf die Höhe des Blutphosphatspiegels aufgehoben und die P-Werte steigen an.

7.2 Wirkung des Testfutters

Das Testfutter 2 ($\text{Ca:P} \approx 4:0,5$; Vitamin D_3 -frei) weist ein sehr weites Ca:P-Verhältnis auf. Die hohe Ca-Konzentration im Darm bewirkt einen verstärkten passiven Transport des Calciums vom Darm in das Blut, bedingt durch das starke Konzentrationsgefälle. Dadurch wird der Ca-Blutspiegel normalisiert und die Parathormonsekretion läßt nach. Gleichzeitig kann durch das Ca-Überangebot im Darm eine P-Ausfällung eintreten. Die dadurch verminderte P-Absorption und das Nachlassen der Parathormonausschüttung führen zu einer drastischen Verringerung des Blutphosphatspiegels auf 2-3 mg P/100 ml Serum. Damit ließen sich die Schwankungen der Serumphosphatwerte erklären. Es ist zu erwarten, daß der individuelle Verzehr der Testdiät von beträchtlichem Einfluß auf diesen "Sturz" des Serum-

phosphats ist. Denn die beschriebenen Wirkungen dieser Diät beruhen auf ihrer hohen Ca-Konzentration und müssen somit in ihrem Ausmaß von der aufgenommenen Ca-Menge abhängen.

Bei den Tieren, die Vitamin D_3 -Gaben erhalten, wirkt sich der Futterverzehr und damit das Testfutter ähnlich aus. Vermehrter Verzehr führt zu einer stärkeren P-Ausfällung, dadurch kann über das $1,25-(OH)_2D_3$, das die aktive Form des Vitamin D auch für die P-Resorption darstellt, nur wenig Phosphat durch den aktiven Transport resorbiert werden. Die Wirkung der Vitamin D_3 -Gabe wird also eingeschränkt. Als Folge davon ist der Blutphosphatspiegel niedriger als bei der verabreichten Dosis zu erwarten wäre.

Wenn die Tiere mit oder ohne Vitamin D_3 -Gabe hungern, zum Beispiel in Einzelfällen bei Verletzungen durch die Schlundsonde, so steigen ihre P-Werte durch eine einsetzende Parathormonbildung an, das Absinken des Ca-Blutspiegels ist der auslösende Faktor für dessen Sekretion. Dieser Effekt läßt keine Beurteilung ihrer Serumphosphatwerte mehr zu. Bei zu hohen P-Werten einiger Tiere muß daher bei einer Verabreichung der Vitamin D_3 -Dosen durch die Schlundsonde immer auch mit einer Verletzung als auslösenden Faktor gerechnet werden.

7.3 Erklärung der tageszeitlichen Schwankungen der Serumphosphatwerte

Die diurnalen Schwankungen der Serumphosphatwerte könnten mit der Lebensweise der Ratten erklärt werden. Sie gehören, wie schon erwähnt, zu den nachtaktiven Tieren. Das wirkt sich natürlich auch auf den Futterverzehr aus, der abends wesentlich größer ist als im Tagesverlauf.

Die vermehrte Futteraufnahme am Abend dürfte bei der "Gruppe 0" zu einer stärkeren P-Ausfällung, einem passiven Ca-Transport, der den Blutspiegel des Calciums nahezu normalisiert und da-

durch zu einer Verringerung der Parathormonsekretion geführt haben. Die geringe passive P-Resorption aus dem Darm und kein Nachschub von Phosphat aus den Knochen über das Parathormon verursachen bei diesen Tieren morgens niedrige P-Werte. Bei Ratten, die Vitamin D_3 -Gaben erhalten, sorgt die vermehrte Ausfällung für eine geringere Resorbierbarkeit des Phosphats durch $1,25-(OH)_2D_3$ und damit auch für niedrige P-Werte.

Tagsüber fressen die Ratten weniger, so daß es jetzt genau zur Umkehr dieses Phänomens kommt, das heißt, die Serumphosphatwerte nehmen durch die verbesserte P-Resorption aus dem Darm und durch die einsetzende Parathormonsekretion bei den Tieren der "Gruppe 0" zu. Die Höhe der Serumphosphatwerte bei den Tieren mit Vitamin D_3 -Gaben wird dagegen durch das $1,25-(OH)_2D_3$ reguliert.

Diese großen tageszeitlichen Schwankungen haben Konsequenzen bei der Versuchsdurchführung. Die Blutentnahme und anschließende P-Bestimmung muß bei einem Versuch zur gleichen Tageszeit durchgeführt werden. Dies gilt auch für mehrere Versuche, deren Wirkungen untereinander verglichen werden sollen.

7.4 Höhe der Serumphosphatwerte

Die Höhe der Serumphosphatwerte hängt also zu einem großen Teil vom Futterverzehr und damit vom Testfutter ab. Auf diesen Futterverzehr können nun viele Umweltfaktoren einen Einfluß ausüben.

Das Lichtprogramm hat aufgrund der Lebensweise der Ratten eine große Bedeutung. Zu hohe Temperaturen und Luftfeuchtigkeit vermindern die Freßlust und führen ebenfalls zu einer Erhöhung der Serumphosphatwerte.

Um die klimatischen Einflüsse auf die Ratten aller Rationsgruppen gleichmäßig verteilen zu können, wurden sie nach dem im Kapitel "Haltung der Versuchstiere" angegebenen Prinzip der Randomisierung in den Versuchsstand eingereiht.

Diese Beispiele zeigen, daß den Haltungsbedingungen eine große Bedeutung zukommt. Sie können die Ergebnisse in einer Weise beeinflussen, die keine quantitative Aussage mehr zuläßt.

Einen wichtigen Parameter stellt das Versuchstier selbst dar. Früher wurden für Vitamin D-Teste nur Versuchstiere verwendet, die völlig Vitamin D-frei aufgezogen worden waren. Die jungen Tiere stammten ihrerseits von Eltern ab, die schon depletiert waren. So wurde eine wirkliche Vitamin D-Freiheit der Versuchstiere erreicht. Heute ist der Aufwand einer eigenen Zuchtkolonie für Vitamin D-Mangeltiere kaum mehr vertretbar. Deswegen werden, wie in diesem Falle, zum Beispiel junge Ratten von einer Versuchstierzucht ohne besondere Spezifikationen hinsichtlich der bisherigen Ernährung und Haltung angekauft. Die Vitamin D-Versorgung dieser Ratten ist unbekannt und vielleicht können bei einigen durch die Depletionsperiode nicht sämtliche Vitamin D-Reserven abgebaut werden. Dies wäre unter Umständen auch eine Möglichkeit, unerwartet hohe Serumphosphatwerte zu erklären.

7.5 Vergleich der Regressionsgeraden

Abbildung 13 gibt die Regressionsgeraden der Versuche V - VIII wieder. Der Versuch IX konnte nicht berücksichtigt werden, denn er besaß keine Gruppe 0.

Ein Vergleich der Steigungen der Geraden läßt erkennen, daß mit zunehmender Höhe der Nullwerte die Steigung abflacht. Die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten dieser 4 Versuche zwischen der Höhe der Nullwerte und den Steigungen ergab für $r_s = -1$ eine jedem Signifikanzniveau genügende negative Korrelation. Sie besagt, daß mit steigendem Nullwert die Geraden weniger ansteigen und umgekehrt. Der Versuch IX läßt aufgrund der Höhe des Wertes für 1 I.E. Vitamin D₃ einen Nullwert von ungefähr 3,3 mg P/100 ml Serum erwarten. Damit würde er die in den 4 Versuchen gefundene Korrelation ebenfalls erfüllen.

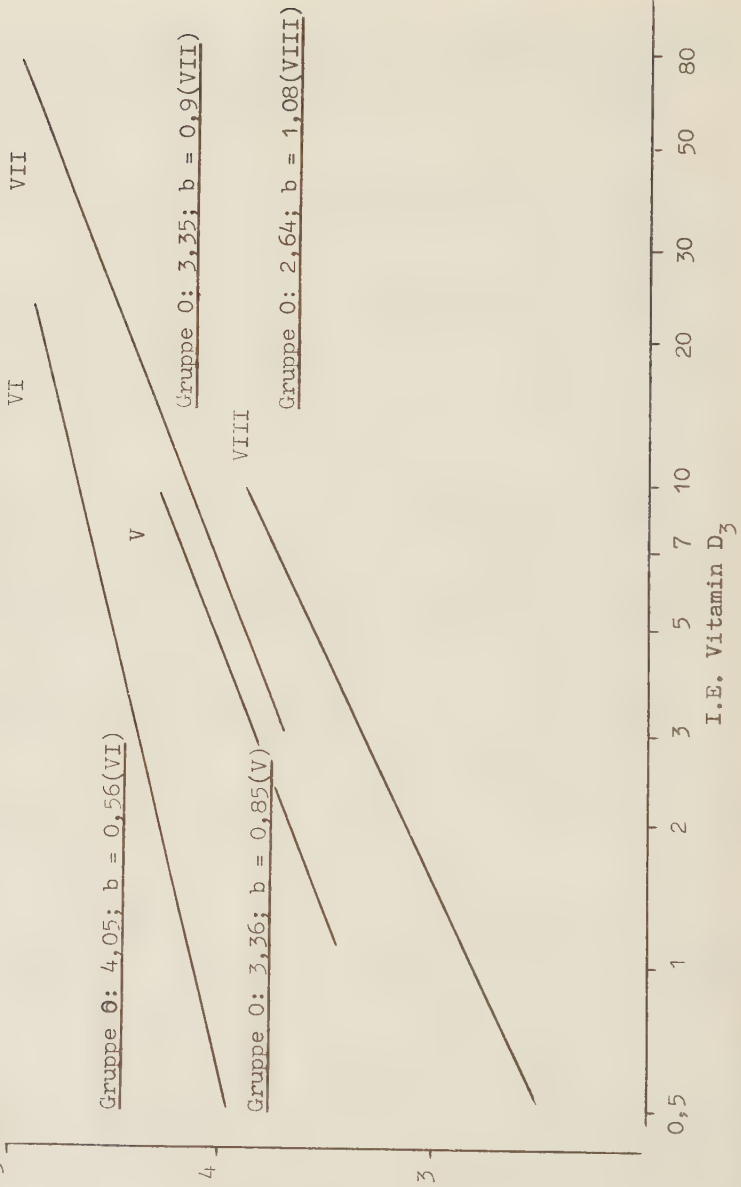
Die sehr enge Beziehung zwischen der Höhe des Serumphosphatwertes der Gruppe 0 und der Steigung der Regressionsgeraden dieser wenigen Versuche deutet auf eine allgemeine Gültigkeit der erhaltenen negativen Korrelation hin. Die flache Steigung der Regressionsgeraden sagt aus, daß bei der Richtigkeit dieser Beziehung ein hoher Serumphosphatwert ohne Vitamin D_3 -Gabe den Effekt der einzelnen Dosierungen nicht mehr so deutlich zur Geltung kommen läßt. Anders ausgedrückt wird die Wirkung einer Vitamin D_3 -Gabe durch einen hohen P-Blutspiegel verschleiert. Die Parameter, die die Höhe des Serumphosphatwertes beeinflussen, wurden im vorigen Kapitel erörtert.

Welchen Aussagewert hat diese Beziehung? Mit dem Abflachen der Geraden werden die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Wirkstoffgruppen geringer, das heißt, die Unterscheidungsmöglichkeit verschlechtert sich. Da diese Versuche dann aufgrund der vorhandenen negativen Korrelation hohe Serumphosphatwerte der Nullgruppen aufweisen, ergibt sich folgender Vorschlag aus diesem Ergebnis. Versuche mit extrem hohen Nullwerten ≥ 4 mg P/100 ml Serum sollten nicht für eine quantitative Aussage herangezogen werden.

Abbildung 13

Vergleich der Regressionsgeraden

mg P/100 ml
Serum



7.6 Beurteilung des Meßbereiches

Um den Meßbereich dieses Testes abzustecken, wurden die Versuche V - IX statistisch ausgewertet. Für diese Versuche wurden die Regressionsgeraden berechnet. Die Erfüllung der Linearitätshypothese und eine signifikante Korrelation war sehr wichtig für das weitere Vorgehen. In den Abbildungen der einzelnen Versuchsergebnisse sind neben der Regressionsgeraden deren 95 %-Vertrauensband und das für alle Einzelwerte dargestellt. Die Berechnung dieser beiden Vertrauensbereiche, ebenso wie der des Regressionskoeffizienten, des Achsenabschnittes und der Restvarianz, dienten einer besseren Beurteilung der Regressionsgeraden.

Die Versuche V und VIII erlauben die Möglichkeit einer quantitativen Aussage im Bereich von 0,5 - 10 I.E. Vitamin D₃, einmalig pro Tier über die Schlundsonde gegeben. Sie lassen außerdem auch erkennen, daß dieser Test über 10 I.E. hinaus noch eine mögliche Beziehung zwischen Vitamin D₃-Konzentrationen und Serumphosphatwerten aufweist. Die Versuche VI und IX bestätigten diese Annahme und zeigten ferner, daß der Meßbereich bis auf 30 I.E. Vitamin D₃ erweitert werden kann. Versuch VII deutete auf eine Plateaubildung von 30 I.E. Vitamin D₃ an hin. Das hieße, daß der Sättigungsbereich bei 30 I.E. erreicht wäre und darüber hinaus keine verwertbare Beziehung mehr zwischen Vitamin D₃-Gaben und Serumphosphatwerten bestünde.

Was sagt überhaupt der Begriff "Meßbereich" aus? Die Ratte ist in diesem Bereich von ihrem Stoffwechsel her in der Lage, die Wirkung der Vitamin D₃-Gabe entsprechend ihrer Konzentration über die Serumphosphatwerte anzuzeigen.

Beschränkende Faktoren des Vitamin D₃-Stoffwechsels sind vor allem die Metabolisierungsschritte in der Leber und Niere, darüber hinaus die Aktivierung des aktiven Transportsystems für Phosphat oder allgemein gesagt, die Kapazität der Darmschranke. Der Meßbereich eines jeden Testes wird also durch die physiologischen Fähigkeiten des Tieres abgesteckt.

8. Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob sich mittels einer diätetisch induzierten akuten Hypophosphatämie eine empfindliche, quantitative Vitamin D- Bestimmung an der Ratte durchführen läßt. Die Hypophosphatämie wird durch Verabreichung einer Diät mit einem sehr hohen Ca-P-Quotienten nach längerer Verfütterung von Diäten mit geringem Ca- und P-Gehalt und schließlich äußerst geringem Ca-Gehalt hervorgerufen. Die 3wöchige Vorperiode dient gleichzeitig zur Vitamin D-Depletion. Die Normalisierung der Hypophosphatämie wird durch Vitamin D-Gaben beschleunigt. Es werden wachsende Ratten verwendet.

Bei der gewählten Versuchsanordnung konnte in einem Bereich von etwa 0,5- 30 I.E. Vitamin D₃, einmalig pro Tier über die Schlundsonde verabreicht, eine eindeutige Beziehung zwischen Vitamin D-Dosen und Serumphosphatspiegel nachgewiesen werden. Als Applikationsvehikel eignen sich sowohl Olivenöl als auch 96 %-Äthanol. 0,2 ml pro Dosis scheinen bei beiden Lösungsmitteln auszureichen. Der optimale Zeitpunkt der Serumphosphatbestimmung (Blutentnahme aus dem retrobulbären Gefäßplexus) ist etwa 48 Stunden nach der Vitamin D-Applikation. Da ein sehr ausgeprägter diurnaler Rhythmus des Serumphosphats nachgewiesen wurde, ist die präzise Einhaltung einer bestimmten Uhrzeit für die Blutentnahme wichtig.

Bei dieser abrupt diätetisch induzierten Hypophosphatämie haben daher der Zeitpunkt und die Menge der Testfutteraufnahme ebenfalls einen starken Einfluß auf die Höhe des Serumphosphatspiegels. Durch Entzug der Testdiät konnte der diurnale Rhythmus scheinbar umgekehrt werden. Unter Außerachtlassung der notwendigen Adaptationsdiätperiode bzw. Depletionszeit, kann nach diesem Verfahren eine Vitamin D-Bestimmung innerhalb von 60 Stunden durchgeführt werden.

Die möglichen Ursachen der in einigen Versuchen noch sehr hohen Streuungen wurden diskutiert.

Das entwickelte Verfahren erscheint grundsätzlich für die biologische Bestimmung kleinster Vitamin D- Konzentrationen geeignet. Für eine befriedigende Reproduzierbarkeit und Genauigkeit müßten jedoch einige der Streuungsursachen näher untersucht und beseitigt werden.

Vitamin D-determination with dietetic induced acute hypophosphatemia

8.1 Summary

The aim of this research topic was to discover whether it was possible to determine sensitivity and quantity of vitamin D in rats. This through an induced, acute hypophosphatemia condition caused by a diet with a very high Ca -P level. This diet precedes feeding period of low Ca-P content feed, culminating in a diet practically free of calcium. Vitamin D-depletion is also achieved during this three-week period. The intake of vitamin D accelerates the return to normalcy of the hypophosphatemia. Growing rats were used in this project.

With the method chosen for the tests, it was proved that there was a distinct relationship between vitamin D₃ doses and the level of serumphosphate. By use of a stomach tube a single dose of vitamin D in a region between 0,5- 30 I.U. was given to each rat. The solution could be applied with olive oil as well as 96% ethanol. 0,2 ml per dose, appeared to suffice. The optimal time to determine the serumphosphate level (blood is taken from the retrobulbare vesselplexus) is approximately 48 hours after the application of vitamin D. In removing blood adherence to a precise clock-time is important as it was proved that there is a very pronounced diurnal cycle.

Therefore with this abrupt, induced hypophosphatemia, the amount and time of feeding has a strong influence on the level of serumphosphate. Through withdrawal of the test diet the diurnal cycle appeared to reverse. By the omission of the three-week feeding period it is possible to determine the level of vitamin D within 60 hours.

The reasons for the very large deviations obtained in some tests, has been discussed.

For the biological determination of the smallest concentrations of vitamin D the method developed, appears to be reasonably suitable. In order to obtain satisfactory, reproducible and accurate results the tests where large deviations were obtained must be scrutinized and these eliminated.

9. Literaturverzeichnis

ASKEW, F.A., R.B. BOURDILLON, H.M. BRUCE, R.G.C.JENKINS

u. T.A. WEBSTER, 1931

The distillation of vitamin D.

Proc.Roy.Soc. (London), Ser. B 107, 76 - 90

BAUMEISTER, M., 1972

Ein neuartiges biologisches Verfahren zur Vitamin
D₃-Bestimmung.

Vet.med.Diss., München

BEKEMEIER, H.u.G. PFENNIGSDORF, 1974

Bestimmung der D-Vitamine

In R. AMMON u. W. DIRSCHERL:

Fermente, Hormone, Vitamine Band III 1, S. 240 - 250

Verlag Georg Thieme, Stuttgart

BIRGE, S.J.u.R. MILLER, 1977

The role of phosphate in the action of vitamin D on
the intestine.

J. Clin. Invest. 60, 980 - 988

BLISS, C.J.u.P. GYÖRGY, 1951

The Animal Vitamin Assays

aus: Vitamin Methods, Volume II

P. Györgi, Academic Press Inc.

Publishers New York, S. 101 - 117

BLUNK, K., 1951

Ein Beitrag zur biologischen Vitamin D-Bestimmung
im Rattentest.

Diss. agr., Kiel

BOYLE, I.T., R.W. GRAY u. H.F. DeLUCA, 1971

Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-
dihydroxycholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalci-
ferol.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2131 - 2134

BOYLE, I.T., L. MIRAVET, R.W. GRAY, M.F. HOLICK u.

H.F. DeLUCA, 1972

The response of intestinal calcium transport to

25-hydroxy and 1,25-dihydroxyvitamin D in
nephrectomized rats.

Endocrinology 90, 605 - 608

BOYLE, I.T., J.L. OMDAHL, R.W. GRAY u. H.F. DeLUCA, 1973

The biological activity and metabolism of 24, 25 -
dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 248, 4174 - 4180

BROCKMANN, H. u. Y.H. CHEN, 1936

Über eine Methode zur quantitativen Bestimmung
von Vitamin D.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, 129 - 133

BRUMBAUGH, P.F. u. M.R. HAUSSLER, 1974

1 α ,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine.

J. Biol. Chem. 249, 1258 - 1262

CAMPOS, C., M. LADIZESKY u. C. MAUTALEN, 1973

Effect of Solanum malacoxylon on the serum levels
of calcium and phosphate in thyroparathyroidectomized
and rachitic rats.

Calc. Tiss. Res. 13, 245-248

CARLSSON, A., 1954

The effect of vitamin D on the absorption
of inorganic phosphate.

Acta Phys. Scandinav. 31, 301 - 307

CHEN, T.C., L. CASTILLO, M. KORYCKA-DAHL u. H.F. DeLUCA, 1974

Role of vitamin D metabolites in phosphate transport
of rat intestine.

J. Nutr. 104, 1056 - 1060

CORRADINO, R.A., R.H. WASSERMAN, M.H. PUBOLS u. S.I. CHANG,
1968

Vitamin D₃ induction of a calciumbinding protein in
the uterus of the laying hen.

Arch. Biochem. Biophys. 125, 378 - 380

CORRADINO, R.A., 1973 a

1,25-dihydroxycholecalciferol:

Inhibition of action in organ-cultured intestine by actinomycin D und α -amanitin.

Nature 243, 41 - 42

CORRADINO, R.A., 1973 b

Embryonic chick intestine in organ culture: response to Vitamin D₃ and its metabolites.

Science 179, 402 - 404

DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN u. A. SPIESS, 1972

Über eine enzootische Kalzinose beim Rind.

5. Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knautgras, Goldhafer und einem Gräsergemisch. (An enzootic calcinosis of cattle. 5. Experimental investigations in rabbits with selective feeding of *Trisetum flavescens*, *Dactylis glomerata* and mixed gramineae).

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 79, 77 - 79

FRASER, D.R. u. E. KODICEK, 1970

Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.

Nature 228, 764 - 766

GALANTE, L., K.W. COLSTON, S.J. McAULEY u.

I. McINTYRE, 1972

Effect of calcitonin on vitamin D metabolism.

Nature 238, 271 - 273

GARABEDIAN, M., M.F. HOLICK, H.F. DeLUCA u. I.T. BOYLE, 1972

Control of 25 - hydroxycholecalciferol metabolism by the parathyroid glands.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1673 - 1676

HARGIS, G.K., E.N. BOWSER, W.J. HANDERSON u.

G.A. Williams, 1974

Radioimmunoassay of rat parathyroid hormone in serum and tissue extracts.

Endocrinology 94, 1644 - 1649

HARRISON, H.E. u. H.C. HARRISON, 1961

Intestinal transport of phosphate:
action of vitamin D, calcium and potassium.

Am. J. Physiol. 201, 1007 - 1012

HAUSSLER, M.R., R.H. WASSERMAN, T.A. McLAIN, M. PETERLIK,

K.M. BURSAC u. M.R. HUGHES, 1976 a

1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside; identification
of a calcinogenic principle of Solanum malacoxylon.

Life Sci. 18, 1049 - 1056

HAUSSLER, M.R., D.J. BAYLINK, M.R. HUGHES, P.F. BRUMBAUGH,

J.E. WERGEDAL, F.H. SHEN, R.L. NIELSEN, S.J. COUNTS,

K.M. BURSAC u. T.A. MCCAIN, 1976 b

The assay of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃:
physiologic and pathologic modulation of circulating
hormone levels.

Clin. Endocr. 5, 151s - 163s

HENRY, H.L., A.W. NORMAN, A.N. TAYLOR, D.L. HARTENBOWER

u. J.W. COBURN, 1976

Biological activity of 24, 25 - dihydroxycholecalciferol
in chicks and rats.

J. Nutr. 106, 724 - 734

HOFMANN, J.H., 1971

Untersuchungen über den Vitamin D₃- Bedarf der japanischen Wachtel.

Vet. med. Diss., München

HOLICK, M.F., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA, T. SUDA u.

R.J. COUSINS, 1971

Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine.

Biochemistry 10, 2799 - 2804

HOLICK M.F., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA, R.W. GRAY, I.T.

BOYLE u. T. SUDA, 1972

Isolation and identification of 24, 25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in the kidney.

Biochemistry 11, 4251 - 4255

HOMMES, M. u. L.P. MIJLL DEKKER, 1973

Gas chromatographic determination of vitamin D in
cod liver oil,

pharmaceuticals and veterinary preparations.

Internat. J. Vit.Nutr. Res. 43, 271 - 282

HUGHES, M.R. T.A. MCCAIN, S.Y. CHANG u. M.R. HAUSSLER, 1977

Presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside in
the calcinogenic plant *Cestrum diurnum*.

Nature 268, 347 - 348

HUMPHREYS, D.J., 1973

Studies on the active principle of *Solanum*
malacoxylon.

Nature New Biology 246, 155 - 157

JONES, G. u. H.F.³ DeLUCA, 1975

High-pressure-liquid-chromatography:
separation of the metabolites of vitamin D₂ and D₃
on small particle silica columns.

J. Lipid Res. 16, 448 - 453

KARG, H., 1953

Untersuchungen über den Vitamin D-Gehalt der Milch unter
besonderer Berücksichtigung seiner analytischen Fest-
stellung.

Vet. med. Diss., München

KLEINER- BOSSALLER, A. u. H.F. DeLUCA, 1974

Formation of 1,24, 25-trihydroxyvitamin D₃ from
1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Biochim. Biophys. Acta 338, 489 - 495

KOWARSKI, S. u. D. SCHACHTER, 1969

Effects of vitamin D on phosphate transport and
incorporation into mucosal constituents of rat
intestinal mucosa.

J. Biol. Chem. 244, 211 - 217

- KROOK, L., R.H. WASSERMAN, J.N. SHIVELY, A.H. TASHJIAN jr.,
T.D. BROKKEN u. J.F. MORTON, 1975 a
Hypercalcemia and calcinosis in Florida horses:
Implication of the shrub, *Cestrum diurnum*, as the
causative agent.
Cornell Vet. 65, 26 - 56
- KROOK, L., R.H. WASSERMAN, K. McENTEE, T.D. BROKKEN u.
M.B. TEIGLAND, 1975 b
Cestrum diurnum poisoning in Florida Cattle.
Cornell Vet. 65, 557 - 575
- LARKINS, R.G., S.J. MCAULEY u. I. MCINTYRE, 1974
Feedback control of vitamin D metabolism by a
nuclear action of 1,25-dihydroxycholecalciferol on the
kidney.
Nature 252, 412 - 414
- LAWSON, D.E.M., D.R. FRASER u. E. KODICEK, 1971
Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol,
a new kidney hormone controlling calcium metabolism.
Nature 230, 228 - 230
- MAWER, E.B. u. J. BACKHOUSE, 1969
An improved system for the separation of metabolites
of isotopically labelled vitamin D₃ on silicic acid
columns.
Biochem. J. 112, 255 - 256
- MCCOLLUM, E.V., N. SIMMONDS, J. BECKER u. P.G. SHIPLEY, 1922
Studies on experimental rickets XXIII.
The production of rickets in the rat by diets consisting
essentially of purified food substances.
J. Biol. Chem. 54, 249 - 252
- MORRIS, W.W. jr., J.B. WILKIE, S.W. JONES u. L. FRIEDMAN, 1962
Differentiation of vitamin D₂ and D₃ by infrared
spectrophotometry.
Anal Chem. 34, 381 - 384
- MURRAY, T.K., K.C. DAY u. E. KODICEK, 1966
The differentiation and assay of vitamin D₂ and D₃
by gas- liquid- chromatography.
Biochem. J. 98, 293 - 296

PETERLIK, M. u. R.H. WASSERMAN, 1976

Control of intestinal phosphate absorption by vitamin D (Abstract).

Israel J. Med. Sci. 12, 1492 - 1493

PETERLIK, M. u. R.H. WASSERMAN, 1978

Effect of vitamin D on transepithelial phosphate transport in chick intestine.

Am.J. Physiol. 234, E 379 - E 388

PINELLI, A., F. WITZKE u. P.P. NAIR, 1969

Separation of vitamin D from cholesterol by thin-layer chromatography.

J. Chromatog. 42, 271 - 274

PONCHON, G. u. H.F. DeLUCA, 1969

The role of the liver in the metabolism of vitamin D.

J. Clin. Invest. 48, 1273 - 1279

PONCHON, G., A.L. KENNAN u. H.F. DeLUCA, 1969

"Activation" of vitamin D by the liver.

J. Clin. Invest. 48, 2023 - 2037

REMP, D.G. u. J.H. MARSHALL, 1938

The antirachitic activity of various forms of vitamin D in the chick.

J. Nutr. 15, 525 - 537

RÜCKEMANN, H. u. K. RANFFT, 1977

Methode zur Bestimmung von Vitamin D mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164, 272 - 273

SACHS, L., 1969

Statistische Auswertungsmethoden

zweite, neubearbeitete und erweiterte Auflage

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

SCHACHTER, D., D.V. KIMBERG u. H. SCHENKER, 1961

Active transport of calcium by intestine: action and bio-assay of vitamin D.

Am.J. Physiol. 200, 1263 - 1271

SCHENCK, F., 1937

Über das kristallisierte Vitamin D₃.
Naturwissenschaften 25, 159

SNYDER, R.H., H.J. EISNER u. H. STEENBOCK, 1951

The determination of vitamin D with radiophosphorus.
J. Nutr. 45, 305 - 317

SPANOS, E., K.W. COLSTON, I.M.S. EVANS, L.S. GALANTE,
S.J. McAULEY u. I. McINTYRE, 1976

Effect of prolactin on vitamin D metabolism.
Mol. Cell. Endocr. 5, 163 - 167

STEELE, T.H., J.E. ENGLE, Y. TANAKA, R.S. LORENE, K.L.
DUDGEON u. H.F. DeLUCA, 1975

Phosphatamic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Am. J. Physiol. 229, 489 - 495

SUDA, T., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES, G. PONCHON, Y. TANAKA
u. M.F. HOLICK, 1970

21, 25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of
vitamin D₃ preferentially active on bone.
Biochemistry 9, 2917 - 2922

TANAKA, Y. u. H.F. DeLUCA, 1971

Bone mineral mobilization activity of 1,25-dihydroxy-
cholecalciferol, a metabolite of vitamin D.
Arch. Biochem. Biophys. 146, 574 - 578

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, J. OMDAHL u. M.F. HOLICK, 1971

Mechanism of action of 1,25-dihydroxycholecalciferol on
intestinal calcium transport.
Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 1286 - 1288

TANAKA, Y. u. H.F. DeLUCA, 1973

The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by
inorganic phosphorus.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 566 - 574

TANAKA, Y., L. CASTILLO u. H.F. DeLUCA, 1976

Control of renal vitamin D hydroxylases in birds
by sex hormones.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2701 - 2705

TAYLOR, A.N., 1974

In vitro phosphate transport in chick ileum: effect
of cholecalciferol, calcium, sodium and metabolic
inhibitors.

J. Nutr. 104, 489 - 494

WALLING, M.W. u. D.V. KIMBERG, 1975

Calcium absorption by intestine:
Stimulation in vitamin D-deficient nephrecto-
mized rats by Solanum glaucophyllum.

Gastroenterology 69, 200 - 205

WASSERMAN, R.H. u. A.N. TAYLOR, 1968

Vitamin D-dependent calcium-binding protein: response
to some physiological variables.

J. Biol. Chem. 243, 3987 - 3993

WINDAUS, A., O. LINSERT, A. LÜTTRINGHAUS u.

G. WEIDLICH, 1932

Crystalline-vitamin D₂.

Liebig's Ann. 492, 226 - 241

WINDAUS, A., F. SCHENCK u. F. von WERDER, 1936

Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt
aus 7-Dehydrocholesterin.

Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 241, 100 - 103

WORKER, N.A. u. B.J. CARILLO, 1967

Enteque seco, calcification and wasting in grazing
animals in the Argentine.

Nature 215, 72 - 74

ZIFFER, H., W.J. HEUVEL, E.O.A. HAAHTI u. E.C.

HORNING, 1960

Gaschromatographic behavior of vitamin D₂ and D₃.

J. Am. Chem. Soc. 82, 6411 - 6412

ZUCKER, H. u. J. GROPP, 1968

Vitamin D₃-Bestimmung über die Eischalenbildung bei
der japanischen Wachtel.

Naturwissenschaften 55, 447

ZUCKER, H., O. KREUTZBERG u. W.A. RAMBECK, 1977

Proceedings of the third workshop on vitamin D,
Asilomar 1977.

W. de Gruyter, Berlin 1977

Der Leitung des Instituts gilt mein Dank für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Professor Dr. H. Zucker möchte ich für die Überlassung des Themas und seine wissenschaftlichen Anregungen danken.

Herrn Dr. W. Rambeck sei für die Unterstützung bei Versuchsvorbereitungen sowie Frau O. Kreutzberg und Frau A. Wetzel für ihr Interesse bei technischen Problemen gedankt.

Schließlich gilt der Doktorandin H. Stark für ihre Mitarbeit mein Dank.

Lebenslauf

Am 7.2.1951 wurde ich als Sohn des außerplanmäßigen Postinspektors Siegfried Gelfert und seiner Ehefrau Eva geb. Paproth in München geboren. Ich besuchte von 1957 - 1962 die Volksschule in München. Bis zum Schuljahr 1971/72 war ich Schüler des Albert-Einstein-Gymnasiums in München 90, Lautererstraße 2.

Am 23.6.1972 wurde mir von dem vorgenannten Gymnasium das Zeugnis der Reife ausgehändigt. Vom 3.11.1972 - 3.11.1977 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Tiermedizin. Ich schloß das Studium mit dem Staatsexamen ab. Seit Januar 1978 bin ich als wissenschaftlicher Hilfsassistent am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der Universität München tätig.

303 77